

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Biología Molecular**



**IMPLICACIONES DE LA PROTEÍNA TAU Y LA  
CORTISTATINA EN LA PROGRESIÓN DE LA  
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**TESIS DOCTORAL**

**Alicia Rubio Garrido**

Madrid, 2008





CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR  
"SEVERO OCHOA"

Madrid, 30 de Septiembre de 2008

Jesús Ávila de Grado, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Mar Pérez, Contratada Ramón y Cajal de la Universidad Autónoma de Madrid

INFORMAN QUE:

La presente tesis doctoral titulada **"Implicaciones de la proteína tau y la cortistatina en la progresión de la enfermedad de Alzheimer"** ha sido realizada bajo nuestra dirección por Alicia Rubio Garrido. Consideramos que el trabajo reviste las características de originalidad y calidad científica requeridas para ser defendido como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor.

Los co-directores de la tesis,

Jesús Ávila

Mar Pérez





A mis padres  
A mis hermanos



---

## Agradecimientos



Esta tesis doctoral no hubiese sido posible sin la ayuda y el apoyo de mucha gente. A todos ellos, muchísimas gracias...

A Jesús Ávila, por la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y por sus enseñanzas. También agradecer a Mar Pérez su paciencia y sus consejos de todo tipo. Muchas gracias a los dos, por la dirección de esta tesis.

A Luis de Lecea, por acogerme en su laboratorio de Estados Unidos y por su inestimable ayuda con el trabajo de cortistatina.

A José J Lucas y a Félix Hernández, muchas gracias por vuestras indicaciones y disponibilidad. Gracias José por aceptarme en tu grupo cuando llegué.

A Isabel Fariñas, por haberme introducido en la neurobiología cuando aún era una estudiante.

A todos aquellos que han compartido conmigo el día a día del laboratorio. A Nuria, Almu, Thorsten, Elena G, Elena T, Pal, Alberto, Elenita, Esther, Raquel, Zahady, Isma y Laura. Muchísimas gracias por los buenos momentos –que han sido muchos-, por vuestro cariño, vuestro apoyo y por crear un ambiente tan agradable en el trabajo.

A la gente del laboratorio de José, del 119 y del antiguo 470, gracias por ser siempre tan amables y ayudarnos con cualquier duda. Gracias también a Héctor y Olga que, en cierto modo, forman parte de nuestro grupo. Gracias a Santi por resolverme siempre los problemas informáticos. También quería recordar a la gente que se ha marchado y echamos de menos: Tobías, Eva, Alfredo, Cristina y Marta. Quería agradecer también el entusiasmo de los estudiantes de Valencia, Jorge y Jero. Gracias a María Teresa Miras por prestar su laboratorio y a Miguel por su trabajo con la acetilcolina y el calcio y su optimismo.

Al personal del Centro de Biología Molecular, especialmente a los Servicios de Microscopía, Genómica y Animalario, muchas gracias por vuestra contribución.

A mi familia, en especial a mis padres y hermanos, por su cariño incondicional. A mis amigos, por lo que son.

Por último, querría mencionar que el desarrollo de este trabajo de investigación ha sido posible gracias a la concesión de una beca de Formación de profesorado universitario del Ministerio de Educación y Ciencia, una beca del Ayuntamiento de Madrid en la Residencia de Estudiantes y un contrato de CIBERNED. Asimismo el laboratorio ha contado con la financiación de los proyectos de la CAM SAL0202/2006, del MEC SAF2003/02697; SAF2006/02424; SAF2006/27523-E; NAN2004/09183-C10-09; GEN2003-20235-C05-01, de CIBERNED CB06/05/0035; CB06/247, del ISCIII FIS C03-06; PI04/0607 y de la Fundación Botín.



---

# Índice





<b>Agradecimientos</b>	<b>i</b>
<b>Índice</b>	<b>v</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>ix</b>
<b>Summary</b>	<b>xiii</b>
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
1. GENERALIDADES SOBRE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	3
1.1. Aspectos genéticos y factores de riesgo de la EA	3
1.2. Características neuropatológicas de la EA	6
1.2.1. Degeneración del sistema colinérgico	6
1.2.2. Placas seniles	9
1.2.3. Ovillos neurofibrilares	9
2. LA PROTEÍNA TAU	11
2.1. Organización proteica	11
2.2. Distribución	13
2.3. Funciones fisiológicas de tau	14
2.3.1. Ensamblaje y estabilización de los microtúbulos	14
2.3.2. Transporte axonal	16
2.3.3. Otras interacciones	16
2.4. Agregación patológica de tau. Hiperfosforilación.	18
2.4.1. Quinasas	19
2.4.2. Fosfatasas	20
3. LA CORTISTATINA	21
3.1. Identificación	21
3.2. Estructura del péptido y del gen de la cortistatina	22
3.3. Expresión de la cortistatina	23
3.4. Receptores de somatostatina	25
3.5. Función	28
<b>Objetivos</b>	<b>31</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>35</b>
1. MATERIALES	37
1.1. Reactivos	37
1.2. Anticuerpos	38
2. MÉTODOS	40
2.1. Mantenimiento de las distintas cepas de ratones	40
2.2. Cultivos celulares	40
2.2.1. Células SH-SY5Y, HEK-293 y COS-7: mantenimiento, transfección y tratamiento	40
2.2.2. Cultivos primarios de neuronas de corteza o de hipocampo de ratón	41
2.3. Western blot (WB)	42
2.4. Inmunofluorescencia	43
2.5. Internalización de Fluo-cortistatina en cultivos primarios de corteza murina	44
2.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa	44
2.7. Purificación de DNA genómico	47
2.8. Determinación fluorimétrica del Ca <sup>2+</sup> intracelular con Fura-2	47
2.9. Purificación de proteínas	49
2.10. Ensayo de viabilidad	49
2.11. Test del reconocimiento de objeto	50
2.12. Análisis estadístico	50

<b>Resultados</b>	<b>51</b>
1. PAPEL DE TAU EN LA PROGRESIÓN DE LA EA	53
1.1. La proteína tau extracelular produce muerte celular de las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y	53
1.2. La proteína tau altera la homeostasis de calcio intracelular de las SH-SY5Y a través de los receptores muscarínicos	55
1.3. Patrón de expresión de los receptores muscarínicos en las SH-SY5Y	58
1.4. Análisis farmacológico para determinar los receptores muscarínicos implicados en el efecto de tau sobre los niveles de calcio intracelular en SH-SY5Y	59
1.5. Transfección transitoria con M1 y M3 en células COS-7 para confirmar la implicación de estos receptores en la movilización de calcio inducida por tau	59
1.6. Identificación de la región de tau capaz de alterar la homeostasis intracelular de calcio en células COS-7 que expresan M3	63
1.7. El calcio intracelular de las neuronas murinas de hipocampo en cultivo aumenta en presencia de la proteína tau	65
2. EFECTO DE DISTINTOS AGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE SOMATOSTATINA (sst) SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE TAU EN LA Ser262	67
2.1. El nivel de fosforilación de la Ser262 de la proteína tau es menor en la corteza de los ratones que no expresan cortistatina	67
2.2. La cortistatina promueve la fosforilación de tau en la Ser262 de cultivos primarios de neuronas corticales murinas	70
2.3. La somatostatina también favorece la fosforilación de tau en la Ser262 pero con una cinética diferente a la de la cortistatina en neuronas corticales murinas en cultivo	73
2.4. El octreotida no afecta a la fosforilación de tau en la Ser262 de neuronas corticales murinas en cultivo	74
2.5. Las neuronas corticales murinas en cultivo presentan receptores que unen cortistatina	76
2.6. Las neuronas corticales en cultivo expresan los cinco subtipos de receptores de somatostatina	78
2.7. Los receptores sst2 y sst4 están implicados en el efecto de la cortistatina sobre la fosforilación de tau en la Ser262	79
2.8. La cortistatina incrementa la fosforilación de tau en la Ser262 probablemente a través de su unión a receptores heterodiméricos compuestos por sst2 y sst4	81
2.9. La PKC fosforila a la proteína tau en la Ser262 en presencia de cortistatina en neuronas corticales murinas	84
<b>Discusión</b>	<b>85</b>
1. PAPEL QUE JUEGA TAU EN EL AVANCE DE LA EA	88
1.2. La proteína tau extracelular induce un aumento en el calcio intracelular a través de M1 y M3	88
1.2. La controversia en torno a la posible toxicidad de la proteína tau	89
1.3. Modelo de propagación de la EA por toxicidad de la proteína tau extracelular	92
2. PAPEL DE LA CORTISTATINA EN EL PASO DE LA PATOLOGÍA DE TAU A LA CORTEZA CEREBRAL	93
2.1. La cortistatina induce la fosforilación de tau en la Ser262	93
2.2. Receptores de somatostatina e internalización	94
2.3. Receptores de somatostatina y heterodimerización	96
2.4. Receptores de somatostatina y señalización intracelular	98
2.5. La posible relación entre cortistatina y somatostatina con la EA	100
<b>Conclusiones</b>	<b>103</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>107</b>
<b>Anexo</b>	<b>143</b>

---

## Abreviaturas



**ACH:** *Acetylcholine* / Acetilcolina  
**AICD:** *APP Intracellular Domain* / Dominio Intracelular del APP  
**AMV:** *Avian Myeloblastosis Virus* / Virus de la Mieloblastosis de Ave  
**Ara-C:** *Arabinofuranosylcytosine* / Arabinofuranosilcitosina  
**ApoE/APOE:** *Apolipoprotein E* / Apolipoproteína E (*gen/proteína*)  
**app/APP:** *Amyloid Precursor Protein* / Proteína Precursora del Amiloide (*gen/proteína*)  
**BACE:**  *$\beta$ -site APP-cleaving enzyme* / Enzima que procesa el APP en el sitio  $\beta$   
**BSA:** *Bovine Serum Albumin* / Seroalbúmina Bovina  
**CA:** Cuerno de Ammon  
**CaMKII:** *Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase II* / Proteína Quinasa dependiente de Calcio/calmodulina  
**CBD:** *Corticobasal Degeneration* / Degeneración Corticobasal  
**CDK5:** *Cyclin-Dependent Kinase 5* / Quinasa Dependiente de Ciclina 5  
**cDNA:** *complementary Deoxyribonucleic Acid* / Ácido Desoxirribonucleico complementario  
**CST-14:** *Cortistatin-14* / Cortistatina-14  
**CSF:** *Cerebrospinal Fluid* / Fluido Cerebroespinal  
**C<sub>T</sub>:** *Threshold Cycle* / Ciclo Umbral  
**CKII:** *Casein Kinase II* / Caseína Quinasa II  
**4-DAMP:** *4-Diphenylacetoxy-N-methylpiperidine* / 4-Difenil-acetoxi-N-metilpiperidina  
**DAPI:** *4',6-Diamidino-2-Phenylindole* / 4',6-Diamidino-2-fenilindol  
**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* / Medio Eagle modificado de Dulbecco  
**DMSO:** *Dimethyl sulfoxide* / Dimetilsulfóxido  
**DNA:** *Deoxyribonucleic Acid* / Ácido Desoxirribonucleico  
**DIV:** *Days in vitro* / Días *in vitro*  
**EA:** Enfermedad de Alzheimer  
**ECL:** *Enhanced Chemiluminescent* / Sustrato quimioluminiscente  
**EDTA:** *Ethylenediaminetetraacetic acid* / Ácido Etildiaminotetraacético  
**EEG:** *Electroencephalography* / Electroencefalografía  
**eNFTs:** *extracellular Neurofibrillary Tangles* / Ovillos Neurofibrilares extracelulares  
**FTDP-17:** *Frontotemporal Dementia and Parkinsonism linked to Chromosome 17* / Demencia Frontotemporal con Parkinsonismo asociada al Cromosoma 17  
**FRET:** *Fluorescence Resonance Energy Transfer* / Fluorescencia tras Transferencia de Energía por Resonancia  
**Fura-2AM:** *Fura-2 acetoxymethyl ester* / Fura-2 acetometil éster  
**GABA:** *Gamma-Aminobutyric Acid* / Ácido Gamma-Aminobutírico  
**GHSR:** *Growth Hormone Secretagogue Receptor* / Receptor Secretagogo de la Hormona de Crecimiento  
**GIP:** *G protein-coupled receptor Interacting Proteins* / Proteínas que Interaccionan con los receptores asociados a proteína G  
**GRK:** *G-protein-coupled Receptor-Kinase* / Receptor Quinasa acoplado a Proteína-G  
**GSK-3:** *Glycogen Synthase Kinase-3* / Glucógeno Sintasa Quinasa-3  
**HA:** *Hemagglutinin* / Hemaglutinina  
**HEPES:** *N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid* / N-(2-hidroxietil)-piperacina-N'-2-ácido etanolsulfónico  
**Hsp70:** *Heat shock protein 70* / proteína de choque térmico 70  
**IF:** *Immunofluorescence* / Inmunofluorescencia  
**IP3:** *Inositol triphosphate* / Inositol trifosfato  
**JNK:** *c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase* / Quinasa c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal  
**kDa:** *kilo Dalton* / kilo Dalton  
**LTP:** *Long Term Potentiation* / Potenciación a largo plazo  
**M1-5:** *Muscarinic Receptor 1-5* / Receptor Muscarínico 1-5  
**MAP:** *Microtubule Associated Protein* / Proteína Asociada a Microtúbulos  
**MAPK:** *Mitogen Activated Protein Kinase* / Proteína Quinasa Activada por Mitógenos

**MARK:** *MAP/microtubule Affinity-Regulating kinase* / Quinasa Reguladora de Afinidad entre MAPs/microtúbulos

**MCI:** *Mild Cognitive Impairment* / Deterioro Cognitivo Leve

**MI:** *Memory Index* / Índice de Memoria

**MrgX2:** *Mas-related G-protein-coupled receptor member X2* / Receptor X2 acoplado a proteína G relacionado con Mas

**mRNA:** *messenger Ribonucleic Acid* / Ácido Ribonucleico mensajero

**NB:** *Neurobasal Medium* / Medio Neurobasal

**NFT:** *Neurofibrillary Tangles* / Ovillos Neurofibrilares

**NMDA:** *N-methyl-D-Aspartate* / N-Metil-D-Aspartato

**NPDPK:** *Non-Proline Directed Protein Kinases* / Quinasas no Dirigidas por Prolina

**NREM:** *Non-Rapid Eye Movement* / Movimientos oculares no rápidos (Sueño Lento)

**NT:** *Neuropil Threads* / Hilos del Neuropilo

**OCT:** *Octreotide* / Octreotide

**PAO:** *Phenylarsine Oxide* / Óxido de Fenilarsina

**pb:** pares de bases

**PBS:** *Phosphate-Buffered Saline* / Solución Salina de Fosfato Tamponada

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction* / Reacción en Cadena de la Polimerasa

**PDPK:** *Proline Directed Protein Kinases* / Quinasas Dirigidas por Prolina

**PHF:** *Paired Helical Filaments* / Filamentos Apareados Helicoidales

**PKA:** *Protein Kinase A* / Proteína Quinasa A

**PKC:** *Protein Kinase C* / Proteína Quinasa C

**PLC:** *Phospholipase C* / Fosfolipasa C

**PP:** *Protein Phosphatase* / Proteína Fosfatasa

**ps / PS:** *Presenilin* / Presenilina (*gen/proteína*)

**PS:** *Population Spikes* / Respuestas Eléctricas Sinápticas

**PSP:** *Progressive Supranuclear Palsy* / Parálisis Supranuclear Progresiva

**PTP:** *Phosphotyrosine phosphatases* / Fosfotirosinas Fosfatasas

**RAMP:** *Receptor-activity-modifying protein* / Proteína que modifica la actividad del receptor

**REM:** *Rapid Eye Movement* / Movimiento Ocular Rápido (Sueño Paradójico)

**rpm:** revoluciones por minuto

**RT-PCR:** *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* / Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa

**SDS:** *Sodium Dodecyl Sulphate* / Dodecil Sulfato Sódico

**SDS-PAGE:** *SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* / Gel de Electroforesis de Poliacrilamida con SDS

**Ser:** *Serine* / Serina

**SF:** *Straight Filaments* / Filamentos rectos

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**SNP:** Sistema Nervioso Periférico

**SRIF-14:** *Somatotropin release-inhibiting factor-14 (Somatostatin-14)* / Factor inhibidor de la liberación de somatotrofina (Somatostatina-14)

**sst 1-5:** *somatostatin receptor 1-5* / Receptor de somatostatina 1-5

**SWS:** *Slow Wave Sleep* / Sueño de Ondas Lentas

**TE:** *Tris EDTA* / Tris EDTA

**TES:** *N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid* / ácido N-Tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfónico

**Thr:** *Threonine* / Treonina

**UV:** *Ultraviolet* / Ultravioleta

**WB:** *Western Blot*

Los términos en inglés se han evitado en la medida de lo posible empleando tan sólo los que consideramos ampliamente aceptados como *western blot* o *primer*.

---

## Summary





*Alzheimer disease (AD) is a senile dementia characterized by the presence of two aberrant structures: senile plaques and neurofibrillary tangles (NFTs). NFTs are intra-neuronal lesions mainly composed by an abnormal hyperphosphorylated form of the microtubule-associated tau protein. NFTs have been shown to follow a characteristic distribution pattern in the brain related with the progression of AD. NFTs are first detected in the entorhinal cortex and the hippocampus, and then, the pathology spreads to the cortex. In this work, we try to find out different factors to explain how AD progresses. In this process, neuronal degeneration occurs and dead neurons can release their intracellular content to the extracellular space. We demonstrate that extracellular tau is toxic to neuroblastoma cells SH-SY5Y in culture. We show that tau interacts with M1 and M3 muscarinic receptors leading to an increase in intracellular calcium levels. This molecular mechanism could probably induce neuronal degeneration explaining the spreading of AD from the entorhinal cortex and the hippocampus to the cortex in advanced stages. The development of tau phosphorylation in the cortex seems critical in the onset of dementia in patients with AD. Here, we suggest that cortistatin could contribute to tau hyperphosphorylation in the cortex. Cortistatin, a neuropeptide related to somatostatin, is mainly expressed in the cerebral cortex. We demonstrate that cortistatin-deficient mice show a decreased tau phosphorylation at Ser262 in the cortex, but not in other brain regions tested. Then, we found that cortistatin induces tau phosphorylation at Ser262 in cultures of murine cortical neurons. The effect of cortistatin is likely mediated by heteromeric receptors composed of somatostatin receptor subtype 2 and 4 and also by protein kinase C signalling. Therefore, our results suggest an important role for cortistatin in promoting tau phosphorylation at Ser262 in the cortex of patients with AD.*



---

# Introducción



## **1. GENERALIDADES SOBRE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a las personas de edad avanzada. Se caracteriza, en su forma típica, por una pérdida progresiva de la capacidad cognitiva, acompañada de apatía emotiva y desconexión del entorno. En los estadios más avanzados, las capacidades motoras llegan a deteriorarse, pudiendo, en última instancia, desencadenar la muerte (Cummings, 2004). La duración de esta enfermedad puede variar entre 2 y 20 años pues difiere enormemente de un individuo a otro. Dicha progresión depende, en gran medida, del grado de avance del deterioro cerebral por muerte neuronal. Los pacientes con EA presentan una atrofia notable en las zonas del cerebro relacionadas con la memoria y las emociones, como la corteza entorrinal, el hipocampo, la amígdala, el lóbulo frontal y la corteza temporal y parietal (Clark et al., 2008). En cambio, el deterioro es menor en la corteza motora y sensitiva (Damasio, 1989). De hecho, en las etapas finales de la EA, el número de neuronas del hipocampo suele reducirse un 84% (Smith, 2002). En las zonas cerebrales más afectadas por la EA, se han identificado dos estructuras aberrantes características: las placas seniles, formadas en su mayoría por el péptido  $\beta$ -amiloide, y los ovillos neurofibrilares, compuestos principalmente por la proteína tau hiperfosforilada.

### **1.1. Aspectos genéticos y factores de riesgo de la EA**

La EA puede clasificarse en dos tipos según su origen o etiología: la forma esporádica, que es la predominante, y la forma familiar autosomal dominante con una incidencia, esta última, de menos de 5% (Campion et al., 1999).

La **EA familiar** es de aparición temprana (alrededor de los 50 años de edad) y se debe a mutaciones puntuales en los genes de la proteína precursora del amiloide (app, cromosoma 21), presenilina-1 (ps-1, cromosoma 14) y presenilina-2 (ps-2, cromosoma 1) (Bird, 2008).

Las mutaciones del gen del app resultan en un aumento en la producción del péptido  $\beta$ -amiloide o en la agregación de este péptido (Seubert et al., 1993). Muchas de las mutaciones puntuales que causan la EA familiar se localizan en las zonas de procesamiento de la  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas (Selkoe, 2001). Los ratones transgénicos que sobre-expresan la proteína APP normal o la proteína APP mutada son modelos para el estudio de la EA y desarrollan, de forma prematura, placas seniles en su cerebro (Games et al., 1995; Puig et al., 2004; Zhang et al., 1997). Los ratones en los que se elimina la expresión del gen de app son viables y no sufren grandes alteraciones salvo gliosis y pequeños cambios en el comportamiento (Zheng et al., 1995). Por otro lado, la dosis génica elevada presente en el síndrome de Down conlleva una sobre-

expresión de APP, responsable, en la mayoría de los casos, de padecer EA prematura (Selkoe, 2001).

Se han identificado más de 100 mutaciones puntuales en los genes de la presenilina-1 y 2. Las mutaciones en el gen de la presenilina-1 son especialmente abundantes puesto que están asociadas a más de un tercio de los enfermos de Alzheimer familiar (Hartmann et al., 2007; Selkoe, 2001). Existe un 67% de homología entre la presenilina-1 (46 kDa) y la 2 (55 kDa) en la secuencia aminoacídica (Laudon et al., 2005; Oh & Turner, 2005; Ratovitski et al., 1997). Los ratones en los que se elimina la expresión de los genes presenilina-1 y 2 pierden la actividad de la  $\gamma$ -secretasa y no producen  $\beta$ -amiloide (De Strooper & Woodgett, 2003).

Curiosamente, no se han encontrado mutaciones del gen de tau en los enfermos de Alzheimer apoyando así la “hipótesis de la cascada amiloide”, en la que se establece que la acumulación de  $\beta$ -amiloide inicia una cascada de reacciones que originan la patología de tau y, por último, la muerte neuronal (Hardy, 2002; Hardy et al., 1986). Sin embargo, los portadores de mutaciones en el gen de tau padecen otro tipo de demencias conocidas como tauopatías. Estas tauopatías se definen como enfermedades neurodegenerativas que presentan depósitos filamentosos de tau hiperfosforilado en neuronas y glía y que cursan con aberraciones en el procesamiento alternativo de tau, los niveles de tau y su grado de fosforilación. Dentro de las tauopatías se incluyen la EA, las demencias frontotemporales, la degeneración corticobasal (CBD), la demencia pugilística, la enfermedad de Niemann-Pick, la enfermedad de Creutzfeld-Jacob, el síndrome de Down, la enfermedad de Pick y la parálisis supranuclear progresiva (PSP). Algunas de éstas tienen origen esporádico, como la EA (salvo los casos de Alzheimer familiar), y otras familiar o genético, como la demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17 (FTDP-17). Por el momento, se han identificado, al menos, 34 mutaciones en los exones 1, 9, 10, 11, 12 y 13 del gen de tau en las familias con FTDP-17 (revisadas recientemente en (Wang & Liu, 2008)). Muchas de estas mutaciones se localizan en la región de unión a microtúbulos de tau (exón 10) y se ha visto que pueden provocar una reducción en la interacción de tau con los microtúbulos (Hong et al., 1998; Hutton et al., 1998) o con otras proteínas (Goedert & Spillantini, 2000). Algunas de estas mutaciones facilitan el autoensamblaje de tau en filamentos anormales (Arrasate et al., 1999), reducen las capacidades de tau para regular la inestabilidad dinámica de los microtúbulos (Bunker et al., 2006) o afectan a la cantidad de tau 4R y 3R (Buee et al., 2000; Glatz et al., 2006; Goedert, 2005; Heutink, 2000; Stanford et al., 2003; Yoshida, 2006). Como en la FTDP-17, también se han descrito otras mutaciones sin sentido relacionadas con la PSP, la CBD y la enfermedad de Pick (Bugiani et al., 1999; Delisle et al., 1999; Murrell et al., 1999).

La **forma esporádica** de la EA tiene, probablemente, un origen multifactorial y suele aparecer a partir de los 60-65 años de edad. A pesar de que el envejecimiento normal no parece ser la causa directa de esta enfermedad, se cree que el mayor factor de riesgo es la edad puesto que la incidencia de la EA aumenta de forma exponencial a partir de los 65 años (Jicha et al., 2008; Jorm & Jolley, 1998; Kawas & Corrada, 2006; Kukull & Bowen, 2002). Otros factores de riesgo de la enfermedad son los antecedentes familiares (Evans et al., 1997; Moritz & Petitti, 1993), la exposición a distintos factores ambientales como pesticidas, metales, toxinas o virus (Doty, 2008) y los factores de riesgo vascular (hipertensión, tabaquismo, aterosclerosis, obesidad, hipercolesterolemia, diabetes mellitus tipo II, fibrilación auricular) (Ott et al., 1999). Algunos trabajos sugieren que la ingesta de vitaminas B12 y folato, antioxidantes como las vitaminas C y E, ácidos grasos insaturados y niveles moderados de alcohol podrían reducir el riesgo de padecer EA (revisados en (Luchsinger & Mayeux, 2004)).

Numerosos genes, como los de la interleukina-1, la óxido nítrico sintasa 3 o el citocromo CYP2D6, se han asociado con un mayor riesgo de padecer la EA (Hartmann et al., 2007). Entre ellos, destaca el estudio del gen de la apolipoproteína E (ApoE). La proteína APOE es la encargada del transporte del colesterol en sangre y entre neuronas y astrocitos. El gen de la ApoE tiene tres alelos: E3, es el más común, E2, parece proteger a una persona de la EA y E4, implica que la enfermedad se inicia a una edad más temprana (Corder et al., 1993; Poirier et al., 1993; Polvikoski et al., 1995; Raber et al., 2004). La APOE4 parece ser menos eficiente en la reutilización de los lípidos de membrana y la reparación neuronal y podría promover la formación de placas amiloides alterando el procesamiento del APP (Holtzman et al., 2000; Poirier, 1994; Prince et al., 2004). También parece que el gen para la proteína  $\alpha$ 2-macroglobulina (Blacker et al., 1998), implicada en la degradación de  $\beta$ -amiloide, o el gen para SORL1 (Rogaeva et al., 2007), que dirige el tráfico del APP en las vías de reciclaje, están relacionados con la predisposición a padecer EA. Estudios recientes muestran que un polimorfismo del gen para CALHM1 presenta una mayor susceptibilidad para sufrir la EA. La CALHM1 es un canal cerebral de calcio que controla los niveles de  $\beta$ -amiloide (Dreses-Werringloer et al., 2008).

Los estudios genéticos asociados con la EA pueden consultarse en: <http://www.alzgene.org> (Bertram et al., 2007).

## 1.2. Características neuropatológicas de la EA

Como se mencionó anteriormente, las características histopatológicas más relevantes de la EA avanzada son la pérdida sináptica y la presencia de placas seniles y ovillos neurofibrilares. La aparición de placas seniles parece estar relacionada con la edad, mientras que los ovillos neurofibrilares correlacionan con la gravedad de la demencia (Arriagada et al., 1992a; Arriagada et al., 1992b).

### 1.2.1. Degeneración del sistema colinérgico

Aunque la EA se ha asociado con el déficit de diferentes neurotransmisores, es la pérdida de innervación colinérgica la que mejor correlaciona con el grado de deterioro cognitivo que sufren estos pacientes (Francis et al., 1999; Geula, 1998; Perry et al., 1981). La degeneración de las aferencias colinérgicas presentes en la corteza y el hipocampo se traduce en la reducción de la recaptación de colina, la disminución de la liberación de acetilcolina y la atrofia de las neuronas colinérgicas del septum y del núcleo basal de Meynert (Blusztajn & Berse, 2000; Francis et al., 1999). Concretamente, en la corteza entorrinal, más de un 80% de la innervación colinérgica puede perderse en los cerebros con EA (Geula & Mesulam, 1996). El deterioro de estas estructuras cerebrales, implicadas en la memoria, unido a la disminución notable del nivel de la colina acetiltransferasa en el hipocampo y en la corteza de los enfermos de Alzheimer (Davies & Maloney, 1976) podrían explicar la pérdida de memoria explícita o declarativa de los pacientes sentando así las bases de la “hipótesis colinérgica” (Coyle et al., 1983). De hecho, la terapia actual frente a la EA se centra en la restauración de los niveles de acetilcolina mediante la administración de inhibidores de la acetilcolinesterasa, como el donepezil, la rivastigmina, la galantamina y la tacrina, durante los primeros estadios de la enfermedad, a pesar de que los beneficios terapéuticos de la misma sobre las funciones cognitivas siguen siendo discutidos (Cummings, 2004; Ladner & Lee, 1998; Raschetti et al., 2007; Trinh et al., 2003).

Los receptores colinérgicos pueden dividirse en muscarínicos y nicotínicos, basándose en la actividad de dos alcaloides agonistas naturales conocidos como muscarina (aislada de la seta *Amanita muscaria*) y nicotina (aislada, a su vez, de la hoja del tabaco *Nicotina tabacum*). Los receptores muscarínicos forman una familia de receptores de membrana metabotrópicos que incluye cinco subtipos diferentes (M1-5). Cada subtipo tiene su propia distribución y farmacología, siendo capaces de modular respuestas tempranas y tardías (revisadas en (Volpicelli & Levey, 2004)). Aunque los cinco subtipos se detectan en el sistema nervioso central, la expresión del M5 es extremadamente baja. En la corteza y el hipocampo de humanos, predomina la expresión de M1 (Piggott et al., 2002). En el caso del ratón adulto, M1 y M3

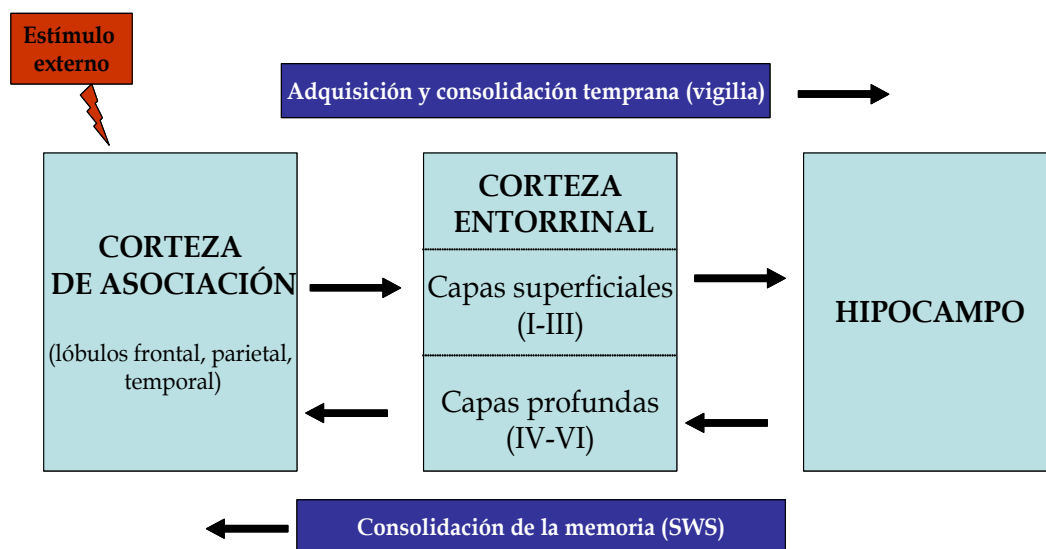


parecen ser los más abundantes en el hipocampo y la corteza entorrinal (Allen Brain Atlas; <http://www.brain-map.org/>). Los receptores M1, M3 y M5, localizados principalmente en las terminales colinérgicas postsinápticas, interaccionan de forma selectiva con las proteínas G de la familia  $G_q/G_{11}$ , mientras que M2 y M4, presinápticos en su mayoría, activan preferentemente a las  $G_i/G_0$  (Wess et al., 2007). De este modo, la activación de los receptores M1, M3 y M5 induce un incremento del calcio intracelular (Lanzafame et al., 2003). En los cerebros de individuos con EA, la cantidad de M2 se ve reducida de forma significativa (Kar et al., 2004). También se ha descrito que los enfermos de Alzheimer presentan una pérdida notable de la proteína G asociada a los receptores M1 (Hellstrom-Lindahl, 2000; Pavia et al., 1998). Como mencionamos, la acetilcolina también puede unirse a los receptores nicotínicos. A diferencia de los muscarínicos, estos receptores forman canales ionotrópicos que, al activarse, permiten el paso de sodio y calcio, causando una rápida despolarización de la membrana plasmática. Los receptores nicotínicos son receptores heterólogos pentaméricos que se componen de dos subunidades  $\alpha$  y tres  $\beta$ . Existen 16 subtipos diferentes que difieren en su distribución cerebral, su estructura y sus características electrofisiológicas y farmacológicas (revisados en (Vazquez-Palacios & Bonilla-Jaime, 2004)). La corteza cerebral y el hipocampo de los cerebros afectados por la EA presentan una reducción en el número de receptores nicotínicos comparados con los cerebros control (Francis et al., 1999; Nordberg et al., 1995).

La acetilcolina ejerce un papel clave en la formación de la memoria declarativa. Durante la vigilia, se produce la adquisición y el procesamiento inicial de la información sensorial que llega del exterior a la corteza de asociación (lóbulos frontal, parietal y temporal). Más adelante, esta información pasa a la corteza entorrinal y, de ahí, al hipocampo (figura 1). El sueño parece ser crítico para la consolidación de la memoria (Gais et al., 2007; Stickgold, 2005). Durante el sueño, el flujo de información se efectúa en las dos direcciones y en repetidas ocasiones según la alternancia de las fases de sueño lento (NREM) y sueño paradójico (REM). En el sueño de ondas lentas (SWS), se produce un tránsito de la información que va desde el hipocampo a la corteza entorrinal y, de ahí a la corteza. Durante el sueño REM, el flujo de información se realiza en sentido contrario. El SWS, que predomina en la primera parte de la noche, parece ser relevante para la formación de la memoria declarativa (Gais & Born, 2004a; Gais & Born, 2004b).

Se ha demostrado que durante el sueño se reactivan las mismas poblaciones neuronales del hipocampo que se activaron originalmente durante la adquisición de la memoria. (Axmacher et al., 2008; Maquet, 2001; Stickgold et al., 2001). De este modo, la información se integra y se almacena a largo plazo en la corteza, especialmente en la corteza prefrontal (Frankland & Bontempi, 2005; Takashima et al., 2006; Wiltgen et al., 2004). En la corteza entorrinal (Nakazawa, 2006; Yasuda & Mayford, 2006) y el hipocampo (Neves et al., 2008; Squire et al., 2004; Suzuki, 2007) se almacena temporalmente la memoria. En apoyo a esta idea,

se ha visto que pacientes con daños restringidos a estas zonas muestran amnesia retrógrada o incapacidad para formar nuevas memorias (Reed & Squire, 1998; Scoville & Milner, 2000; Squire & Zola-Morgan, 1991). La corteza entorrinal es una de las primeras estructuras dañadas en la EA (Braak & Braak, 1991). Esta zona cerebral es crítica para la formación de la memoria puesto que representa el principal flujo de entrada de información al hipocampo a través de las capas superficiales y el mayor flujo de salida del hipocampo a través de las capas profundas (Dolorfo & Amaral, 1998; Witter et al., 1989). Se ha visto que los niveles de acetilcolina son altos durante la vigilia y el sueño REM y bajos durante el SWS, por tanto se postula que la acetilcolina media los cambios de dirección del flujo de información entre las tres estructuras cerebrales implicadas en la formación de la memoria mediante la supresión de la transmisión sináptica glutamatérgica excitatoria de CA3 a la corteza entorrinal (Buzsaki, 1996; Hasselmo, 1999; Steriade, 2004).



**Figura 1.** Representación esquemática del modelo de la adquisición y consolidación de la memoria.

### 1.2.2. Placas seniles

Las placas seniles (10-120  $\mu\text{m}$  de diámetro) son depósitos amiloides extracelulares (Glenner & Wong, 1984) que también pueden encontrarse en la corteza normal de personas de edad avanzada (Maccioni et al., 2001). Estas estructuras pueden ser difusas o pre-amiloides con depósitos amorfos de  $\beta$ -amiloide y evolucionar a placas neuríticas compuestas por depósitos insolubles de  $\beta$ -amiloide rodeados por neuritas distróficas (axones y dendritas dañadas), astrocitos reactivos y microglía activada (Selkoe, 2001). El péptido  $\beta$ -amiloide deriva de los cortes proteolíticos secuenciales de la proteína APP realizados por varias proteasas (Kang et al., 1987; Masters et al., 1985). La célula produce el  $\beta$ -amiloide 40, en mayor cantidad, que el  $\beta$ -amiloide 42. Este último, al ser más hidrofóbico, puede agregarse y plegarse en hoja  $\beta$ -lámina con más facilidad que el  $\beta$ -amiloide 40 e interaccionar con otras proteínas extracelulares que podrían propiciar la formación de placas seniles (Citron et al., 1996; Neve et al., 2000). En un primer momento, se pensó que las placas eran neurotóxicas pero más tarde se ha propuesto que los oligómeros solubles de  $\beta$ -amiloide, capaces de inhibir el LTP hipocampal y dificultar la plasticidad sináptica, podrían ser los responsables del inicio de los déficits cognitivos (Rowan et al., 2007). También se ha visto que el péptido  $\beta$ -amiloide puede inducir apoptosis *in vivo* e *in vitro* (Forloni et al., 1993; Selkoe, 2001).

### 1.2.3. Ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares (NFT) consisten en inclusiones filamentosas formadas dentro del citoplasma perinuclear y, ocasionalmente, presentes en las dendritas proximales de las neuronas. También pueden detectarse NFT en las células gliales de algunas enfermedades neurodegenerativas como, por ejemplo, la CBD y la PSP (Bergeron et al., 1997). Los hilos del neuropilo (NT) se localizan en el interior de los segmentos dendríticos, sin implicar al axón, y están formados por unas estructuras filamentosas dispersas. Tras la muerte celular, el material insoluble se mantiene y es conocido como ovillos fantasma o también como ovillos neurofibrilares extracelulares (eNFT) (Braak & Braak, 1991). Ultraestructuralmente, estas alteraciones neurofibrilares contienen filamentos de morfología característica compuestos mayoritariamente por la proteína tau hiperfosforilada (Grundke-Iqbal et al., 1986). La gran mayoría se denominan filamentos apareados helicoidales (PHF) porque consisten en dos haces entrecruzados uno sobre otro con una periodicidad de 65-80 nm y un grosor de 10-30 nm (Kurt et al., 1997). También se encuentran, aunque en menor cantidad, otro tipo de filamentos que no parecen tener una morfología helicoidal. Éstos son conocidos como filamentos rectos (SF) y poseen un diámetro de unos 15 nm (Kurt et al., 1997).

Por otro lado, se ha visto que los enfermos de Alzheimer y de otras tauopatías también pueden presentar otro tipo de agregados aberrantes de tau, conocidos como cuerpos de Hirano (Galloway et al., 1987; Gibson & Tomlinson, 1977). La relevancia de estas estructuras en cuanto a la patología de las enfermedades neurodegenerativas sigue sin establecerse. En los cuerpos de Hirano, la proteína tau no se encuentra en forma fibrilar y está asociada a filamentos de actina (Hirano, 1994).

En 1991, Braak y Braak (Braak & Braak, 1991) demostraron que la distribución de la patología neurofibrilar en la EA sigue un patrón topográfico característico que empieza en la corteza transentorrinal (propia de los estadios I y II), progresa hacia la corteza entorrinal, el hipocampo, la amígdala y la corteza temporal adyacente (límbico, estadios III y IV) y finaliza en el resto de la corteza (estadios V y VI). Este patrón correlaciona con el grado de demencia de modo que, los estadios I y II son asintomáticos, los III y IV son propios de los pacientes con Deterioro Cognitivo Leve (MCI) y, por último, los enfermos de Alzheimer se encuentran en los V y VI (Lovell & Markesbery, 2007). Cabe destacar la importancia de la aparición de la patología de tau en la corteza pues representa un momento crítico en el desarrollo de los síntomas propios de la enfermedad (Braak & Braak, 1991; Delacourte et al., 1999). Este trabajo junto con el que muestra que existe una correlación entre el número de NFT y el grado de demencia de los pacientes con EA (Arriagada et al., 1992a; Arriagada et al., 1992b), relacionan, por primera vez, la patología de tau con la progresión de la EA y la muerte neuronal. Este tema está siendo discutido en la actualidad puesto que, por el momento, no se sabe si tau induce la muerte neuronal debido a una pérdida de función del tau normal o a una ganancia de función de tau debida a su toxicidad. Tampoco se sabe cómo se produce el avance de la patología de tau. Ambos temas serán tratados a lo largo de esta tesis doctoral.

## **2. LA PROTEÍNA TAU**

### **2.1. Organización proteica**

El gen de tau contiene 16 exones y el procesamiento alternativo de los exones 2, 3 y 10 da lugar a seis isoformas distintas en el sistema nervioso central de humanos (figura 2) (Neve et al., 1986). Las variantes de tau difieren unas de otras por la presencia de 3 o 4 repeticiones en la parte carboxilo-terminal de la molécula, codificadas por los exones 9-12, y la presencia o ausencia de uno o dos insertos en la parte amino-terminal, codificados por los exones 1 y 3 (Goedert et al., 1989a; Goedert et al., 1989b).

La proteína tau se divide en las cuatro regiones siguientes en base a su estructura y su función que se detallarán más adelante (figura 2):

1. Dominio de proyección: Puede contener uno, dos o ninguno de los insertos amino-terminales de 29 aminoácidos cada uno (Goedert et al., 1989a; Goedert et al., 1989b). El nombre de dominio de proyección viene dado porque esta región se proyecta fuera de la superficie del microtúbulo pudiendo interaccionar con otras estructuras y otras proteínas (Brandt et al., 1995; Hirokawa et al., 1988). Otra de las funciones atribuidas a este dominio es la de mantener el diámetro de los haces de microtúbulos (Chen et al., 1992; Frappier et al., 1994; Georgieff et al., 1991).

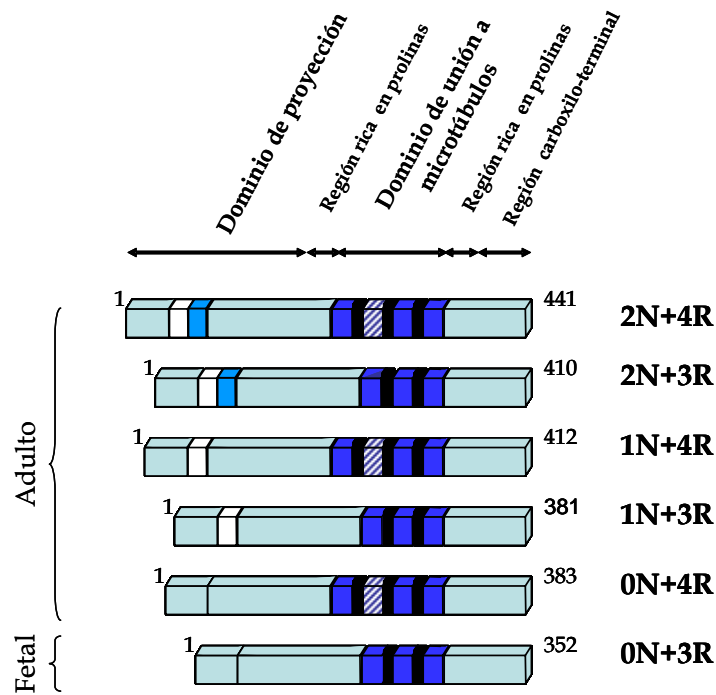
2. Región rica en prolinas: Flanquea la región de las repeticiones. Está constituida por serinas/treoninas seguidas de prolinas. Estas secuencias constituyen sitios de reconocimiento de determinadas quinasas y están implicadas en la regulación funcional por fosforilación.

3. Región de las repeticiones o dominio de unión: Comprende 3 o 4 repeticiones casi idénticas de 31 aminoácidos en tándem. Cada repetición está formada por una secuencia altamente conservada de 18 aminoácidos seguida de otra zona menos conservada de 13 o 14 aminoácidos conocida como dominio de inter-repetición (Goedert et al., 1989a). Diversos experimentos demuestran que tau se une a la tubulina a través de esta región (Aizawa et al., 1989; Lee et al., 1989).

4. Región carboxilo-terminal: Contiene varios residuos susceptibles de fosforilación.

Aunque las seis isoformas presentes en el sistema nervioso central parecen ser funcionalmente similares, es muy probable que la distinta composición exónica confiera funciones fisiológicas diferentes. De hecho, las isoformas de tau pueden estar distribuidas de forma diferencial en subpoblaciones neuronales. Por ejemplo, los mRNAs de tau que contienen el exón 10 no se encuentran en células granulares del giro dentado (Goedert et al., 1989a). Los

factores que determinan el procesamiento del exón 10 se han estudiado con detalle (D'Souza & Schellenberg, 2000; D'Souza & Schellenberg, 2002). Este proceso podría implicar mecanismos de fosforilación de factores de transcripción como el SC35 tras la activación de la glucógeno quinasa  $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ) (Hernandez et al., 2004). Por otro lado, la expresión de las distintas isoformas de tau varía durante el desarrollo: en estadios fetales, tan sólo la isoforma 3R sin insertos está presente (Goedert & Jakes, 1990), sin embargo, durante la etapa adulta se detectan las seis isoformas (Hong et al., 1998). Como las isoformas con 4 repeticiones se unen con mayor afinidad a los microtúbulos que las de 3 (Lee et al., 1989), la presencia de 3 repeticiones en estadios tempranos del desarrollo podría conferir al citoesqueleto la plasticidad necesaria para la formación de sinapsis y la migración neuronal (Goedert & Jakes, 1990).



**Figura 2.** Estructura de las diferentes isoformas de la proteína tau humana presentes en el sistema nervioso central. El procesamiento alternativo del transcrito primario de tau genera seis isoformas distintas que difieren unas de otras por la presencia o ausencia de uno o dos insertos (0N, 1N o 2 N) y por la presencia de 3 o 4 repeticiones (3R o 4R). De modo que las seis isoformas de tau son: 2N+4R; 1N+4R; 0N+4R; 2N+3R; 1N+3R; 0N+3R o tau fetal. Estas isoformas contienen entre 352 y 441 aminoácidos y sus pesos moleculares varían entre 45 y 62 kDa (Goedert et al., 1989a; Goedert et al., 1989b).

La proteína tau sufre diversas modificaciones postraduccionales como la fosforilación, la glicosilación, la glicación, la ubiquitinación, la deaminación, la oxidación, la sumoización, la nitración o la truncación entre otras (revisadas detalladamente en (Avila et al., 2004; Gong et al., 2005; Wang & Liu, 2008)). La glicación sólo se detecta en situaciones patológicas. El resto de modificaciones postraduccionales pueden detectarse en condiciones normales pero en niveles bajos. Los niveles de estas modificaciones se ven incrementados de forma notable en las enfermedades neurodegenerativas (Khatoon et al., 1994). Debido a la complejidad de las isoformas de tau es habitual visualizar en un *western blot* múltiples bandas inmunoreactivas con distinto peso molecular aparente. En SDS-PAGE, los PHF purificados a partir de cerebros de EA dan lugar a tres bandas mayoritarias a la altura de 60, 64 y 68 kDa y otra minoritaria de 72 kDa (Greenberg & Davies, 1990; Greenberg et al., 1992; Grundke-Iqbal et al., 1986). Por el contrario, cuando las muestras que contienen los PHF se tratan con fosfatasa alcalina y se analizan por *western blot* se detectan seis bandas que se corresponden con las seis isoformas mayoritarias de la proteína tau (Goedert & Jakes, 1990).

## 2.2. Distribución

En cerebro humano adulto y mediante el uso de la técnica de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, tau se detecta en distintas regiones que incluyen la corteza, el hipocampo, el tálamo, el estriado y el cerebelo (Goedert et al., 1989b; Trojanowski et al., 1989) siendo más abundantes, en todos los casos, las isoformas de 3 repeticiones frente a las de 4 (Goedert et al., 1989b). Al parecer, los niveles de tau soluble disminuyen con la edad aproximadamente un 14% por década a partir de los 20 años de edad (Mukaetova-Ladinska et al., 1993; Mukaetova-Ladinska et al., 1996). Esta disminución es especialmente importante en la corteza frontal y el hipocampo y es más pronunciada en los casos con EA (Mukaetova-Ladinska et al., 1993; Mukaetova-Ladinska et al., 1996). En ratón, tau se expresa en la corteza y el hipocampo, también en cerebelo aunque en menor cantidad (Santa-Maria et al., 2005). La distribución de tau en la corteza cerebral humana se centra en las células piramidales predominantemente en las capas más profundas (Goedert et al., 1989b; Kosik et al., 1989). En el hipocampo, las isoformas de tau con 3 repeticiones se detectan en las células piramidales de CA y del subiculum y en las granulares del giro dentado, en cambio, como se mencionó anteriormente, las variantes de 4 repeticiones sólo aparecen en las piramidales (Goedert et al., 1989b).

La proteína tau se encuentra mayoritariamente en las neuronas (Goedert et al., 1989b; Kosik et al., 1989), aunque también puede estar presente en las células gliales en algunas enfermedades neurodegenerativas (Arrasate et al., 1997; Chin & Goldman, 1996; Shin et al., 1992). A nivel sub-celular, tau se localiza en el citoplasma, preferentemente en los axones (Goedert et al., 1989b; Kosik et al., 1989), y puede estar asociado a las mitocondrias (Rendon et al., 1990), a los ácidos nucleicos (Hua et al., 2003; Kampers et al., 1996) y a la membrana plasmática (Brandt et al., 1995).

La fosforilación de tau afecta a su distribución celular en el cerebro adulto y en las neuronas en desarrollo. Por ejemplo, tanto la unión de tau a los microtúbulos como su interacción con la membrana plasmática están reguladas por fosforilación (Arrasate et al., 2000; Lindwall & Cole, 1984). Además, en las neuronas en desarrollo se ha descrito que el tau fosforilado en la región rica en prolinas se encuentra en su mayoría en el compartimento somatodendrítico y el desfosforilado en la región distal del axón (Dotti & Banker, 1987). En el cerebro de los pacientes con EA y otras tauopatías, la distribución mayoritaria de tau deja de ser axonal, en este caso, la proteína tau hiperfosforilada forma agregados que se localizan en el compartimento somatodendrítico (Buee et al., 2000).

## **2.3. Funciones fisiológicas de tau**

### **2.3.1. Ensamblaje y estabilización de los microtúbulos**

La proteína tau pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) y se caracterizó por primera vez como un factor de ensamblaje de microtúbulos (Cleveland et al., 1977; Fellous et al., 1977; Weingarten et al., 1975; Witman et al., 1976). El tau, que es especialmente abundante en los axones de las neuronas, parece ser esencial en la iniciación y la elongación de los microtúbulos y en su posterior estabilización (Caceres & Kosik, 1990; Drubin & Kirschner, 1986). Estudios sucesivos de microinyección de tau en fibroblastos demostraron *in vivo* que tau se asocia a la tubulina induciendo su polimerización y la estabilización de los microtúbulos sin ser capaz de cambiar la morfología celular (Drubin & Kirschner, 1986). Sin embargo, la expresión de tau en células Sf9 de ovario de insecto mediante infección con un vector baculoviral sí altera la forma redondeada característica de estas células e induce la formación de largas extensiones citoplasmáticas similares a los axones neuronales (Knops et al., 1991; Knowles et al., 1994). Además, en este mismo modelo celular, se ha visto que tau proporciona estabilidad a los microtúbulos y protege frente al nocodazol (Baas et al., 1994).



En relación con lo anterior, también cabe destacar el papel de tau en el crecimiento neurítico (Drubin et al., 1985; Ferreira et al., 1989) y en la polaridad neuronal (Caceres & Kosik, 1990). En células PC12 y en neuronas de cerebelo se observó un aumento de la expresión de tubulina y de tau durante la elongación axonal y dendrítica (Drubin et al., 1985; Ferreira et al., 1989). Posteriormente, Cáceres et al. (1990) demostraron que la inhibición de la expresión de tau en neuronas cerebelares mediante el uso de oligonucleótidos antisentido impedía la formación del axón a pesar de la correcta extensión de las neuritas exploratorias (Caceres & Kosik, 1990).

Tau se une a los microtúbulos a través de las repeticiones del dominio de unión a tubulina (Lee et al., 1989; Trinczek et al., 1999). En condiciones fisiológicas, tau está en constante equilibrio dinámico de unión y desunión de los microtúbulos. Y se cree que este equilibrio está controlado principalmente por el estado de fosforilación de tau. La afinidad de tau por los microtúbulos es mayor si la región carboxilo-terminal de tau está fosforilada. En cambio, ocurre lo contrario si la fosforilación de tau se localiza en el dominio de unión a microtúbulos o en la región rica en prolina, aunque el efecto de la fosforilación en esta última zona es menor (Biernat et al., 1993; Biernat & Mandelkow, 1999; Drewes et al., 1995; Liu et al., 2007; Wang et al., 2007). Por otro lado, se ha demostrado que, aunque una única repetición es capaz de unirse a la tubulina (Lee et al., 1989), la secuencia con mayor capacidad de unión a los microtúbulos está constituida por la primera repetición, la siguiente interrepetición y la segunda repetición (región R1-R2) (Goode et al., 1997). Recientemente, distintos grupos postulan que las repeticiones de tau se unen a bolsillos específicos de  $\beta$ -tubulina en la superficie interna de los microtúbulos. Las regiones ricas en prolina, cargadas positivamente, parecen unirse fuertemente a la superficie de los microtúbulos que están cargados negativamente y el dominio de proyección, de carga negativa, forma “ramificaciones” en la superficie de los microtúbulos debido posiblemente a repulsiones electrostáticas (Amos, 2004; Kar et al., 2003). De este modo, el dominio de proyección podría mantener un espaciamiento entre los microtúbulos del axón gracias a su interacción con otras proteínas, como las de los neurofilamentos (Chen et al., 1992; Frappier et al., 1994; Georgieff et al., 1991). En apoyo a esta idea y teniendo en cuenta que la isoforma de tau del sistema nervioso periférico es mayor (Couchie et al., 1992), se ha descrito que el diámetro axonal en el sistema nervioso periférico es mayor respecto al del sistema nervioso central (Georgieff et al., 1991).

### **2.3.2. Transporte axonal**

Diversos trabajos sostienen que tau podría tener un papel en el control del transporte axonal de moléculas de señalización, factores tróficos e incluso orgánulos celulares, como mitocondrias o vesículas (revisado en (Ballatore et al., 2007)). También se sugiere que ciclos frecuentes de unión y desunión de tau de los microtúbulos (que se corresponde con fosforilaciones y desfosforilaciones respectivamente) pueden ser necesarios para que el transporte axonal sea efectivo. El dominio de unión a tubulina de tau parece competir con la proteína motora quinesina en la unión a los microtúbulos provocando un descenso en el transporte axonal anterógrado (Ebner et al., 1998; Stamer et al., 2002; Trinczek et al., 1999). La sobre-expresión de tau en células neuronales y no neuronales altera la morfología celular y la distribución de varios orgánulos que necesitan el transporte axonal vía quinesina (Ebner et al., 1998; Trinczek et al., 1999). Este transporte anterógrado parece estar regulado por fosforilación de tau mediada por GSK3 $\beta$  (Tatebayashi et al., 2004). También se ha descrito que la sobre-expresión de tau inhibe el transporte del APP y que éste se acumula en el soma neuronal (Stamer et al., 2002). Sin embargo, datos recientes ponen en duda el papel de tau en el transporte axonal (Yuan et al., 2008). Este trabajo demuestra que el transporte axonal no se ve afectado por la sobre-expresión o la falta de tau en la retina murina (Yuan et al., 2008).

### **2.3.3. Otras interacciones**

Al margen de la unión de tau a la tubulina, la proteína tau también puede interactuar con otras estructuras o proteínas diversas pudiendo llegar a tener un papel desconocido en una gran variedad de funciones.

El dominio de unión a tubulina de tau interactúa con la PS-1 y ésta, a su vez, se une a GSK3 $\beta$ . Estos datos sugieren que PS-1 facilita la fosforilación de tau favoreciendo la aproximación del sustrato a la enzima (Takashima et al., 1998). También se ha visto que el dominio de unión a tubulina de tau está implicado en la interacción con la histona desacetilasa 6 (Ding et al., 2008). Esta enzima, implicada en neurodegeneración (Olzmann et al., 2007; Pandey et al., 2007), es clave en la regulación de la dinámica de la red citoesquelética (Gao et al., 2007; Tran et al., 2007; Zhang et al., 2007) y en el control de varias respuestas celulares al estrés (Boyault et al., 2007; Kawaguchi et al., 2003; Kwon et al., 2007).

El dominio de proyección de tau se proyecta fuera de la superficie del microtúbulo e interacciona con otros elementos (Brandt et al., 1995; Hirokawa et al., 1988). De hecho, se ha propuesto que los insertos de este dominio, ricos en residuos ácidos, podrían unir cationes tales como el hierro (Arrasate et al., 1997). Otros motivos identificados en esta región incluyen la secuencia KKXX que está implicada en la unión a heparina (Arrasate et al., 1997).

Las secuencias PXXP, presentes en la región rica en prolinas de tau, podrían estar involucradas en la interacción de tau con dominios SH<sub>3</sub> de proteínas como las familias de tirosinas quinasas fyn o src (Jenkins & Johnson, 1998; Lee et al., 1998). Esta región podría estar implicada en la unión de tau a proteínas asociadas a la membrana plasmática (Arrasate et al., 2000; Brandt et al., 1995). La fosforilación de tau regula la unión de tau a las proteínas con SH<sub>3</sub> puesto que estudios *in vitro* muestran que la unión de tau fosforilado a estas proteínas es menor que en el caso del tau no fosforilado (Reynolds et al., 2008). También se ha visto que no se produce unión en presencia de tau hiperfosforilado aislado de cerebros humanos con EA (Reynolds et al., 2008). Estos datos sugieren que tau podría estar implicado en la transducción celular de señales y que ésta podría verse afectada en la EA. En apoyo a lo anterior, se ha descrito que un ratón deficiente en tau presenta un incremento en la expresión del factor de transcripción c-fos (Oyama et al., 2004). La unión de tau a las proteínas de las familias fyn o src podría resultar en la fosforilación de tau en tirosina (Lee, 2005; Lee et al., 1998).

Se sabe muy poco sobre el posible papel de tau como regulador de la expresión génica en el núcleo. Antes de ser transportado al núcleo, la proteína tau se fosforila en el citosol (Greenwood et al., 1997). El tau se ha detectado en el núcleo celular, principalmente en células en división (Brady et al., 1995) y, se cree que, en el núcleo, el tau se une al DNA inhibiendo su amplificación (Li et al., 2005). Esta unión depende del estado de agregación de tau y, sin embargo, no depende de su nivel de fosforilación (Hua & He, 2002). La interacción de tau con las mitocondrias, la membrana plasmática y los ácidos nucleicos sugiere que tau puede actuar como un mediador entre los microtúbulos y estos orgánulos (Hua et al., 2003).

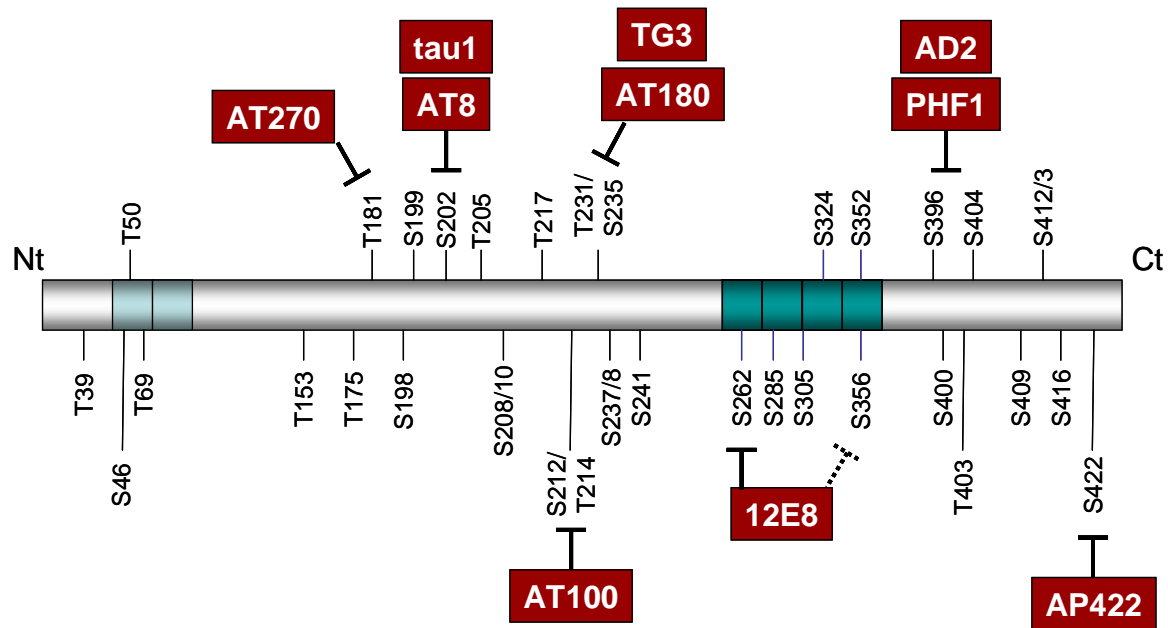
En definitiva, la proteína tau parece contribuir directa o indirectamente sobre la modulación estructural y reguladora de funciones celulares siendo de vital importancia su acción sobre la red de microtúbulos para mantener la morfología apropiada de las neuronas y su correcto funcionamiento.

## **2.4. Agregación patológica de tau. Hiperfosforilación.**

En condiciones patológicas, como se ha explicado, se altera el equilibrio dinámico de la unión de tau a los microtúbulos provocando un aumento anormal del nivel de tau libre en el interior neuronal. A pesar de que tau es una proteína soluble debido a su alto contenido en residuos hidrofílicos (Lee et al., 1988), el aumento de la concentración de tau citosólico podría favorecer el cambio de conformación de tau a una conformación patogénica “mal plegada” que predispone a la agregación (Ballatore et al., 2007). Además, dado que tau es bastante propenso a interactuar con otras estructuras –sobre todo, cuando no está unido a los microtúbulos–, esto también podría favorecer su mal plegamiento y su ensamblaje. Primero, se forman pequeños agregados de tau no fibrilares (Maeda et al., 2007; Sahara et al., 2007), un material insoluble que se infiltra progresivamente en el citoplasma y, ocasionalmente, en las dendritas proximales formando, más adelante, las características inclusiones filamentosas de NFT (Galvan et al., 2001).

Se han descrito diversas causas que podrían provocar o contribuir al aumento de la concentración de tau libre. Estos factores incluyen un aumento de la fosforilación de tau en los residuos de serinas y treoninas (Andersen, 2004; Moreira et al., 2005; Rapoport et al., 2002). Esta fosforilación parece ser un paso previo al ensamblaje de la proteína si se localiza en el dominio de unión a microtúbulos de tau (Perez et al., 2000; Schneider et al., 1999). Por el contrario, la polimerización se ve impedida si la fosforilación de tau se sitúa en la región rica en prolinas o en el extremo carboxilo-terminal (Alonso Adel et al., 2004; Liu et al., 2007).

De entre los 79 residuos de serina o treonina susceptibles de fosforilación en la isoforma humana de tau de mayor longitud, más de 30 han sido identificados en los cerebros con EA utilizando anticuerpos frente a tau dependientes de fosforilación, espectrometría de masas y secuenciación (figura 3) (Hanger et al., 1998; Hanger et al., 2007; Hasegawa et al., 1992; Morishima-Kawashima et al., 1995; Wang & Liu, 2008). Aunque estos sitios se localizan principalmente en la región rica en prolinas y la región carboxilo-terminal de tau, la estabilización de los microtúbulos se ve afectada en mayor grado por la hiperfosforilación de tau en los sitios situados en la región de unión a los microtúbulos como la Ser262, Ser285, Ser305, Ser324, Ser352 y Ser356 (Cho & Johnson, 2003; Drewes et al., 1995; Sengupta et al., 1998; Singh et al., 1996). La detección en el fluido cerebrospinal (CSF) de hiperfosforilación de tau o de aumento en los niveles de tau total puede utilizarse como marcador de la neurodegeneración. Concretamente, la fosforilación de tau en la Thr231 y la Thr181 detectada en el CSF de los pacientes con MCI parece estar asociada con el futuro desarrollo de la EA (Arai et al., 2000; Buerger et al., 2002a; Buerger et al., 2002b; Hansson et al., 2006). Estos datos sugieren que la fosforilación en esos sitios está relacionada con el inicio del proceso patológico de la EA.



**Figura 3.** Representación de los sitios principales de hiperfosforilación de la mayor isoforma de la proteína tau identificados en los cerebros con EA. Se señalan los anticuerpos específicos dependientes de fosforilación, a excepción del anticuerpo tau-1, que reconoce la secuencia de aminoácidos 189-207 desfosforilados de la proteína tau (Gong et al., 2005; Gotz et al., 2001; Hanger et al., 1998; Hanger et al., 2007; Hasegawa et al., 1992; Morishima-Kawashima et al., 1995; Wang & Liu, 2008).

El nivel de fosforilación de tau es la consecuencia del balance entre la fosforilación por quinasas y la desfosforilación por fosfatasas.

### 2.4.1. Quinasas

Las quinasas capaces de fosforilar estos sitios se dividen en dos grupos (Baudier et al., 1987; Correas et al., 1992; Drewes et al., 1992; Goedert et al., 1997; Hanger et al., 1992; Morishima-Kawashima et al., 1995):

- las quinasas dirigidas por prolinas, como la GSK3 $\beta$  (Ishiguro et al., 1992), la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5) (Hosoi et al., 1995), la MAP quinasa (p38), la quinasa c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal (JNK) y otras quinasas activadas por estrés (Atzori et al., 2001; Buee-Scherrer & Goedert, 2002; Ferrer et al., 2001). Estas quinasas reconocen una secuencia de serina/treonina seguida por prolina (Ser-Pro y Thr-Pro) y generalmente fosforilan a tau en las regiones ricas en prolinas adyacentes a la región de las repeticiones de la molécula. En estas regiones se sitúan la mayoría de los residuos fosforilados de tau.

- las quinasas no dirigidas por prolinas, como la proteína quinasa A (PKA) (Scott et al., 1993; Sironi et al., 1998), la proteína quinasa C (PKC) (Correas et al., 1992; Gomez-Ramos et al., 2003), la calmodulina quinasa II (CaMKII) (Bennecib et al., 2001; Sironi et al., 1998), las quinasas reguladoras de afinidad entre MAPs (MARK) (Drewes et al., 1997) o la caseína quinasa II (CKII) (Correas et al., 1992). Estas quinasas fosforilan a tau en el dominio de unión a tubulina, salvo la CKII que modifica residuos cercanos a los insertos del dominio de proyección (Greenwood et al., 1994).

De entre las quinasas implicadas en la hiperfosforilación anómala de tau, cabe destacar el papel relevante de la GSK3 $\beta$  y su importancia como posible diana terapéutica (Mazanetz & Fischer, 2007). GSK3 $\beta$  fosforila a la proteína tau en sitios comunes a los PHF en células en cultivo (Lovestone et al., 1996) y colocaliza con tau fosforilado en cerebros de pacientes con la EA (Shiurba et al., 1996). Además, la relación entre la sobre-expresión de GSK3 y la hiperfosforilación de tau ha sido establecida en distintos modelos animales (Engel et al., 2006a; Engel et al., 2006b). También se ha visto que la inhibición de GSK3 con litio no sólo reduce la fosforilación de tau *in vivo*, sino que también disminuye el nivel de agregación de tau, comparado con los controles (Noble et al., 2005). Por otro lado, se ha establecido una conexión entre el péptido  $\beta$ -amiloide y la fosforilación de tau. Al parecer, el efecto neurotóxico del péptido  $\beta$ -amiloide podría deberse a una activación de GSK3 y el resultante aumento de la fosforilación de tau (Alvarez et al., 1999; Ferrari et al., 2003). De hecho, el litio provoca una reducción de la producción de  $\beta$ -amiloide en modelos murinos de la EA (Phiel et al., 2003).

#### **2.4.2. Fosfatasas**

En los cerebros humanos con EA, muchos de los sitios fosforilados se desfosforilan más lentamente durante el periodo *post-mortem* que en el caso de los cerebros control (Garver et al., 1994; Matsuo et al., 1994). Estos resultados sugieren que, en la EA, la actividad de las fosfatasas (PP) es menor. Esta hipótesis se comprobó posteriormente puesto que se vio que la expresión, cantidad y actividad de la PP2A se reducen significativamente en las zonas cerebrales afectadas por la EA, como la corteza y el hipocampo, a diferencia de lo que ocurre en las regiones no afectadas, como el cerebelo, o en los individuos controles (Loring et al., 2001; Sontag et al., 2004; Vogelsberg-Ragaglia et al., 2001).

A pesar de que se han identificado diversas fosfatasas (PP) en el cerebro (PP1, PP2A, PP2B (o calcineurina), PP2C y PP5), la PP2A parece ser la más relevante en la regulación del estado de fosforilación de tau en la EA (Bennecib et al., 2001; Goedert et al., 1995; Liu et al., 2005; Saito et al., 1995; Sontag et al., 1996). Se ha comprobado que la inhibición de PP2A con ácido

okadaico provoca hiperfosforilación de tau en sitios comunes a los que se encuentran en la EA. Esto no ocurre cuando se inhibe selectivamente a la PP2B con ciclosporina A (Sontag et al., 1999). Al parecer, la menor actividad de PP2A contribuye a la hiperfosforilación de tau no sólo por una menor tasa de desfosforilación de tau sino también por la activación de distintas quinasas como la CamKII, MAP quinasas y quinasas activadas por estrés (Bennechib et al., 2001; Kins et al., 2003; Pei et al., 2003). La PP2A también parece estar implicada en ciertos casos de FTDP-17. Las mutaciones de estos pacientes, localizadas en el dominio de unión de tau, dificultan la unión de la PP2A a tau y, de este modo, se favorece la hiperfosforilación anómala de tau (Goedert & Spillantini, 2000).

Como mencionamos, la EA se inicia en la región entorrinal (Braak & Braak, 1991) extendiéndose posteriormente a la zona límbica y a la corteza, siendo la patología en la corteza la que da lugar a la demencia. En la corteza, las señales (activación de quinasas y fosfatasas) que podrían promover la patología de tau podrían tener una cierta especificidad. Por ello, se ha pretendido analizar si péptidos presentes en la corteza, como la cortistatina, podrían jugar algún papel en la patología de tau.

### **3. LA CORTISTATINA**

#### **3.1. Identificación**

En 1996, el grupo del Dr. de Lecea aisló un clon de cDNA de una nueva proteína a partir de una librería de sustracción de hipocampo de rata (de Lecea et al., 1996). La secuencia nucleotídica predecía una proteína putativa de 112 aminoácidos que llamaron preprocortistatina debido a su patrón de expresión mayoritario en la corteza cerebral (de Lecea et al., 1996). Esta proteína comparte homologías estructurales con la preprosomatostatina (de 116 residuos) y el extremo carboxilo-terminal es la única zona que comparte secuencia aminoacídica (de Lecea et al., 1996). El corte de la secuencia señal (secuencia hidrofóbica de 27 residuos), en el extremo amino-terminal de la preprocortistatina, produce la procortistatina. Esta proteína es sustrato de prohormona-convertasas que reconocen secuencias con un tándem de residuos básicos (KR; KK) y que originan cortistatina-29, -14 o -13 (de Lecea et al., 1996; de Lecea et al., 1997b). Cabe destacar que la cortistatina-13 no está relacionada con ningún producto conocido. La cortistatina-29 y -14 se producen aproximadamente en cantidades similares y, aunque la cortistatina-14 se libera preferentemente al exterior celular, por el

momento, aún no se han descrito funciones biológicas específicas para cada una de ellas (Galanopoulou et al., 1993).

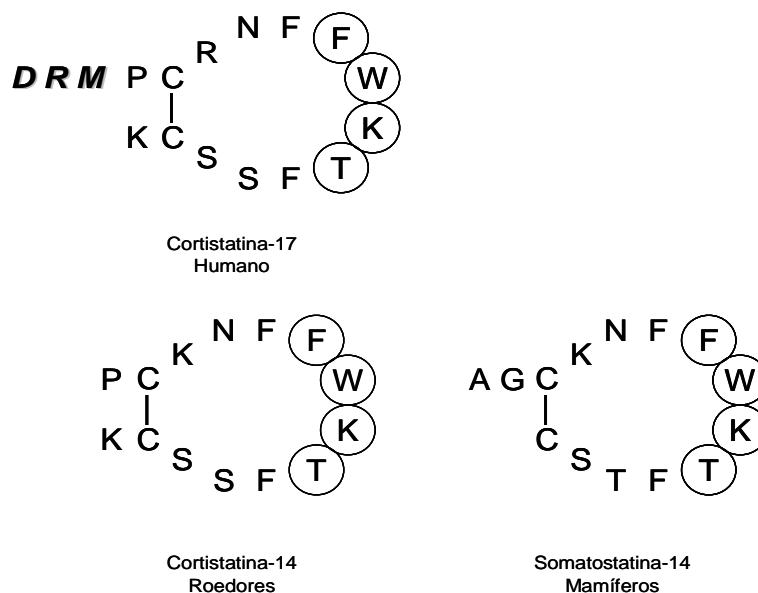
Posteriormente, se obtuvo el cDNA que codifica para la preprocortistatina de ratón, de humano y de rana (de Lecea et al., 1997a; Fukusumi et al., 1997; Tostivint et al., 2006). En ratón, se identificaron tan sólo dos sitios putativos de corte (R; KK) que originan la cortistatina-44 y la cortistatina-14 (de Lecea et al., 1997b). La secuencia nucleotídica humana presenta un menor grado de identidad con la de rata (71%). La preprocortistatina humana puede ser procesada en varios sitios dando cortistatina-29, -17, -21 y -31 (de Lecea et al., 1997b; Fukusumi et al., 1997). La cortistatina-21 y -31 no están conservadas en otras especies. Este proceso es análogo al de la preprosomatostatina y la prosomatostatina que originan la somatostatina-28 y -14 (Brazeau et al., 1973; Epelbaum et al., 1994; Spier & de Lecea, 2000). Más tarde, la presencia de cortistatina-14 se demostró *in vivo* mediante el uso de la técnica de HPLC en los ratones modificados genéticamente que no expresan somatostatina (Ramirez et al., 2002).

### 3.2. Estructura del péptido y del gen de la cortistatina

La cortistatina-14 comparte 11 de sus 14 aminoácidos con la somatostatina-14 incluyendo dos cisteínas que le proporcionan al péptido una estructura cíclica y la secuencia FWKT, crítica en la unión con los receptores de somatostatina (figura 4) (Spier et al., 2005; Veber et al., 1979). En rata y ratón, las secuencias aminoácidas de la cortistatina están altamente conservadas, sin embargo, el péptido humano contiene tres aminoácidos más en el extremo amino-terminal y una arginina es sustituida por una lisina (cortistatina-17) (de Lecea et al., 1997b). La distribución y las propiedades biológicas de la cortistatina humana son similares a las de roedores (Fukusumi et al., 1997).

A pesar de las similitudes con la somatostatina, la secuencia nucleotídica y la localización cromosómica (de Lecea et al., 1996; de Lecea et al., 1997b) indican que la cortistatina y la somatostatina provienen de genes distintos. El gen de ratón para la cortistatina se sitúa en el cromosoma 4 (se corresponde con la región 1p36 de humanos) y el de somatostatina en el 16 (3q28 de humanos) (Spier & de Lecea, 2000). El gen de preprocortistatina contiene dos exones y un intrón, como el de preprosomatostatina (Spier & de Lecea, 2000). Se ha demostrado que los genes de somatostatina y de cortistatina provienen de la duplicación de un mismo gen ancestral de la familia de la urotensina (Tostivint et al., 2006).





**Figura 4.** Estructura de la cortistatina-17, la cortistatina-14 y la somatostatina-14. Las secuencias FWKT son claves en la unión con los receptores de somatostatina (Spier et al., 2005; Veber et al., 1979).

### 3.3. Expresión de la cortistatina

Las zonas del cerebro de ratón y rata adultos con mayor expresión de preprocortistatina son la corteza y el hipocampo según los resultados obtenidos utilizando las técnicas de *northern blot* e hibridación *in situ* (de Lecea et al., 1996; de Lecea et al., 1997b). Como mencionamos, ambas áreas cerebrales son especialmente vulnerables en la EA (Braak & Braak, 1991). Otras zonas del cerebro presentan cortistatina en menor cantidad: el bulbo olfatorio, el estriado, la amígdala y el núcleo periventricular hipotalámico (de Lecea et al., 1996; de Lecea et al., 1997b). El nivel de expresión de somatostatina en este último núcleo es especialmente elevada (Patel, 1999).

El mayor número de células con cortistatina se encuentra en la corteza cerebral, especialmente en las capas II-III y VI y no se detecta expresión de cortistatina en la capa I (de Lecea et al., 1996; de Lecea et al., 1997b). La distribución de preprocortistatina no es uniforme en todas las áreas corticales: los niveles de cortistatina más altos se encuentran en la corteza visual/temporal y los más bajos en la corteza somatosensorial. La cortistatina también se expresa en la corteza piriforme y entorrinal (de Lecea et al., 1997a). En el hipocampo de ratón y rata, la cortistatina se detecta en el subiculum y CA1, algo menos en CA3 y, en niveles más bajos, en la capa granular del giro dentado (de Lecea et al., 1996; de Lecea et al., 1997a; de Lecea

et al., 1997b). La distribución de la preprocortistatina descrita mediante el uso de hibridación *in situ* ha sido confirmada por inmunohistoquímica en cerebro de rata (de Lecea, 2007).

La preprosomatostatina se expresa en el stratum oriens y stratum radiatum de CA, el subiculum y la corteza (Braun et al., 1998). Posteriormente, mediante PCR cuantitativa en muestras de cerebro humano, se vio que la somatostatina se expresa en las mismas zonas cerebrales (corteza frontal, hipocampo, puente y tronco cerebral, enumeradas de mayor a menor abundancia) que la cortistatina (Dalm et al., 2004). Sin embargo, a diferencia de la cortistatina, la somatostatina se detecta en todos los casos en mayor cantidad (Dalm et al., 2004).

Experimentos de doble hibridación *in situ* en ratón y rata muestran que la cortistatina sólo se expresa en interneuronas GABAérgicas inhibitorias (de Lecea et al., 1996; de Lecea et al., 1997a; de Lecea et al., 1997b). Las neuronas que expresan cortistatina pertenecen a la subpoblación de interneuronas GABAérgicas que expresan calbindina y parvalbúmina (proteínas de unión a calcio) (de Lecea et al., 1997a). A pesar de que la somatostatina también se expresa en interneuronas GABAérgicas (Esclapez & Houser, 1995; Kosaka et al., 1988), menos de la mitad de las neuronas que expresan cortistatina en la corteza y el hipocampo de rata presentan también somatostatina, y aproximadamente un cuarto de las células con somatostatina expresan cortistatina (de Lecea et al., 1997a). De modo que la somatostatina y la cortistatina comparten un patrón de expresión parcialmente solapado (de Lecea et al., 1997a).

El patrón de expresión de la cortistatina parece ser más amplio de lo que en un principio se pensó. Se ha demostrado que la cortistatina, como la somatostatina aunque en menor cantidad, también se expresa en tejidos humanos periféricos como en: riñón, estómago, colon, testículos, pulmón y distintos tumores (Dalm et al., 2004; Ejekkar et al., 2000). Cabe destacar que la cortistatina, a diferencia de la somatostatina, se encuentra en células y tejidos humanos del sistema inmune (Dalm et al., 2004; Dalm et al., 2003). En definitiva, estos datos sugieren que la cortistatina también tiene una función en tejidos periféricos siendo notable su papel en el sistema inmune (Dalm et al., 2004; Dalm et al., 2003).

La preprocortistatina comienza a expresarse en los cerebros de ratas de entre 5 y 10 días de edad, alcanzando los máximos niveles de expresión en torno a los 15 días de edad, y, posteriormente, la intensidad de la expresión se reduce progresivamente durante la edad adulta (de Lecea et al., 1997a). La cortistatina podría estar modulando el establecimiento de las conexiones sinápticas en la corteza y el hipocampo durante el desarrollo puesto que su patrón de expresión correlaciona con la maduración de interneuronas corticales. La aplicación de cortistatina-14 en rodajas de hipocampo adulto no parece afectar a las medidas de excitabilidad de las células granulares, sin embargo, en ratas P15, la amplitud de las respuestas eléctricas sinápticas (PS) se ve reducida (de Lecea et al., 1997a). De igual forma, se ha descrito una expresión transitoria de la somatostatina en la corteza de rata en desarrollo sugiriendo también,

un papel relevante de la somatostatina en la diferenciación y la formación de sinapsis (Cavanagh & Parnavelas, 1988; Parnavelas & Cavanagh, 1988). Los estudios de inmunocitoquímica y autorradiografía muestran que la expresión máxima de somatostatina se detecta a las dos semanas de edad y ésta disminuye progresivamente hasta alcanzar los niveles del individuo adulto (Cavanagh & Parnavelas, 1988; Parnavelas & Cavanagh, 1988).

Durante el envejecimiento normal, los niveles de preprocortistatina en el hipocampo de ratones aumentan (Winsky-Sommerer et al., 2004) mientras que la expresión de la somatostatina parece disminuir en humanos y en primates (Hayashi et al., 1997; Lu et al., 2004). Estos datos sugieren un papel diferencial de ambos neuropéptidos en el envejecimiento.

### **3.4. Receptores de somatostatina**

La cortistatina se une a los cinco subtipos conocidos de receptores para la somatostatina (sst1-5 según la nomenclatura de la IUPHAR (Hoyer et al., 1995)) (de Lecea et al., 1996; Fukusumi et al., 1997). La cortistatina-14 de roedores y la cortistatina-17 de humanos desplazan la unión de la <sup>125</sup>I-somatostatina-14 a los cinco receptores de somatostatina humanos clonados en líneas de células transfectadas (Criado et al., 1999; Fukusumi et al., 1997) y en tejido humano del timo (Dalm et al., 2003) con afinidades similares a las de la somatostatina en el rango del nanomolar. Como la somatostatina y la cortistatina comparten un patrón de expresión parcialmente solapado, en algunos casos, ambos neuropéptidos podrían competir por los mismos receptores o ser liberados de distintas terminales nerviosas (de Lecea et al., 1997a).

Estos receptores, descritos por primera vez en células GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> de pituitaria (Schonbrunn & Tashjian, 1978), han sido clonados a partir de tejidos de humano, rata, ratón, cerdo y vaca y pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G con siete dominios hidrofóbicos  $\alpha$ -hélice transmembrana, un extremo amino-terminal extracelular y carboxilo-terminal intracelular (Patel, 1999; Weckbecker et al., 2003; Yamada et al., 1992).

En humanos, los receptores sst1-5 están codificados por cinco genes independientes no alélicos localizados en los cromosomas 14q13, 17q24, 22q13.1, 20p11.2 y 16p13.3, respectivamente (Meyerhof, 1998; Patel, 1999). Cabe destacar que los genes de sst1, 3, 4, 5 no contienen intrones, en cambio, el gen de sst2 de rata, ratón y humano contiene tres intrones y genera, por procesamiento alternativo, dos isoformas proteicas de distinto tamaño en su extremo carboxilo-terminal: sst2a y sst2b (Moller et al., 2003; Olias et al., 2004). La variante corta (sst2b) no se expresa abundantemente en humanos (Moller et al., 2003; Olias et al., 2004). La similitud de las secuencias entre los distintos subtipos es notable (39-57%) y altamente conservada entre distintas especies (81-98% para ratón, humano y rata) (Meyerhof, 1998). Los

receptores sst1-5 humanos tienen de 1 a 4 sitios de N-glicosilación en el segmento amino-terminal y el segundo bucle extracelular (Patel, 1999) (tabla 1). Los receptores de somatostatina humanos presentan de 3 a 8 sitios putativos de fosforilación mediada por la PKA, la PKC y la quinasa calmodulina II en el segmento carboxilo-terminal y en el segundo y tercer bucle intracelular (Patel, 1999). En base a propiedades estructurales, filogénicas y farmacológicas, los receptores de somatostatina pueden dividirse en dos grupos principales (Hoyer et al., 1995):

- **SRIF<sub>1</sub>**: sst2, sst3 y sst5 que presentan mayor afinidad por los análogos de somatostatina siguientes: el octreotide (SMS-201-995), seglitide (MK-678) y lanreotide (BIM-23014)
- **SRIF<sub>2</sub>**: sst1 y sst4

El sst5 es el único receptor que muestra cierta preferencia de unión por la somatostatina-28 frente a la somatostatina-14, sin embargo, sst1-4 presentan una afinidad similar por ambos péptidos (Moller et al., 2003).

Numerosos estudios, la mayoría realizados en tejido de rata y ratón, usando las técnicas de hibridación *in situ*, RT-PCR, ensayos de unión y, más tarde, de inmunohistoquímica, muestran que los receptores de somatostatina están ampliamente distribuidos en el cerebro y en los tejidos periféricos (gastrointestinal, páncreas y sistema inmunitario) con distintos patrones de expresión, comunes en algunos casos (Kreienkamp, 1999; Patel, 1999) (tabla 1). La expresión de sst2, 3 y 4 se centra en distintas zonas del cerebro incluyendo corteza e hipocampo y su expresión disminuye hacia la zona caudal. El receptor sst5 es el menos abundante y el menos estudiado. En la corteza, la expresión de sst2 está más restringida a las capas profundas, mientras que sst1 está presente en todas las capas (Moller et al., 2003). La expresión de sst2a y sst2b es, en algunos casos, diferente, por ejemplo: mediante hibridación *in situ* se vio que la expresión de sst2a es mucho mayor que la de sst2b en la corteza de ratón (Vanetti et al., 1994). Los receptores de somatostatina también se expresan en tumores: sst2 preferentemente; sst1, 3, 5 menos frecuentemente y el sst4 se detecta raramente (Reubi et al., 2001). Estos estudios revelan que la mayor parte de las células expresan no sólo uno sino distintos subtipos diferentes de receptores de somatostatina.

Los receptores de somatostatina se expresan mayoritariamente en neuronas, también se detectan en glía aunque en menor cantidad (Feindt et al., 1995; Heidet et al., 1990; Hosli & Hosli, 1994; Mentlein et al., 1990; van Calker et al., 1980). Su localización sub-celular y su función pueden variar según el subtipo al que pertenezcan (tabla 1). Los receptores de somatostatina con función presináptica modulan la liberación de la somatostatina y de otros neurotransmisores (Schulz et al., 2000). Cabe destacar la localización de los sst3 en cilios neuronales (9+0). Estos cilios no son motores (9+2) y se sostiene que los receptores de los cilios puedan actuar como sensores químicos del medio (tipo olfativos) (Schulz et al., 2000).

<i>Receptor</i>	<i>Amino- ácidos</i>	<i>Sitios de glicosilación/ fosforilación</i>	<i>Localización sub-celular (Función)</i>	<i>Distribución</i>	<i>Agonistas selectivos</i>	<i>Antagonistas selectivos</i>
<b>sst1</b>	391	3/6	Axones (presináptica)	corteza, hipocampo, bulbo olfatorio, amígdala, núcleo habenular, núcleo periventricular, substancia nigra, colículos, cerebelo, pituitaria anterior, médula espinal	CH-275, L-797,591	NVP-SRA880
<b>sst2</b>	369/356	4/8	Somato-dendrítica (postsináptica)	corteza, hipocampo, bulbo olfatorio, amígdala, núcleo habenular, colículos, cerebelo, pituitaria anterior, médula espinal	MK-678 (Seglitide), BIM- 23027, L-054,522, L-779,976	Cyanamida- 154806
<b>sst3</b>	418	2/5	cilios neuronales (remanentes del desarrollo o medir la concentración de somatostatina en el medio)	corteza, hipocampo, bulbo olfatorio, amígdala, núcleo habenular, substancia nigra, colículos, cerebelo, pituitaria anterior, médula espinal	L-796,778	sst3-ODN- 8NVP- ACQ090
<b>sst4</b>	388	1/3	Somato-dendrítica (postsináptica)	corteza, hipocampo, bulbo olfatorio, amígdala, núcleo habenular, substancia nigra, colículos, cerebelo (menos en la capa de Purkinje), pituitaria anterior, médula espinal	NNC 26- 9100, L-803,087	
<b>sst5</b>	364	3/5	Somato-dendrítica (postsináptica)	corteza, hipocampo, bulbo olfatorio, amígdala, núcleo habenular (?), núcleo periventricular, substancia nigra (?), colículos (?), cerebelo, pituitaria anterior, médula espinal (?)	L-817,818	BIM-23056

**Tabla 1. Resumen de las características principales de los receptores de somatostatina (sst1-5).** El número de aminoácidos, de sitios de glicosilación y fosforilación se refieren a los receptores de somatostatina clonados de humanos (Selmer et al., 2000; Weckbecker et al., 2003). La localización sub-celular y la función de los receptores de somatostatina sst1 (Helboe et al., 1998), sst2 (Dournaud et al., 1998; Dournaud et al., 1996; Helboe et al., 1999; Schindler et al., 1999; Schindler et al., 1997), sst3 (Handel et al., 1999; Mitsuma et al., 1997), sst4 (Schreff et al., 2000) y sst5 (Stroh et al., 1999) se han estudiado en tejido cerebral de rata, ratón y humano. Los datos de su distribución en las distintas zonas del sistema nervioso central (Breder et al., 1992; Dournaud et al., 1996; Hervieu & Emson, 1998; Perez et al., 1995; Schindler et al., 1995; Schindler et al., 1999; Selmer et al., 2000) también se han obtenido a partir de experimentos realizados en rata, ratón y humano. Por último, se presentan los agonistas y antagonistas selectivos de sst1-5 (revisados en (Siehler et al., 2007; Weckbecker et al., 2003)).

La activación por el ligando de un receptor de somatostatina suele provocar la formación de dímeros e incluso entidades multiméricas que podrían implicar a otros tipos de receptores acoplados a proteínas G (Rocheville et al., 2000a; Rocheville et al., 2000b). Posteriormente, se puede inducir la internalización del complejo ligando-receptor. Ambos fenómenos aumentan la complejidad del sistema pudiendo modificar las propiedades funcionales y de unión de los receptores (Rocheville et al., 2000a; Rocheville et al., 2000b).

Los receptores de somatostatina interaccionan con un amplio rango de señales intracelulares formando un sistema complejo donde los agonistas de estos receptores se unen a distintos subtipos en un contexto de estimulación auto-, para- y endocrina (tabla 2) (Cervia & Bagnoli, 2007; Patel, 1999). La unión de un ligando a los receptores de somatostatina induce la activación de varias enzimas claves, como la adenilato ciclasa, las fosfotirosinas fosfatasas (PTPasas) y las MAPKs, y cambios en los niveles intracelulares de calcio, de fosfolipasa  $\beta 2$  y  $\beta 3$  (PLC $\beta 2$  y PLC $\beta 3$ ) y de inositol trifosfato (IP3) (Cervia & Bagnoli, 2007; Schindler et al., 1996).

	<i>sst1</i>	<i>sst2</i>	<i>sst3</i>	<i>sst4</i>	<i>sst5</i>
Adenilato ciclasa	↓	↓	↓	↓	↓
Fosfotirosina fosfatasa	↑	↑	↑	↓↑	↑
MAPK	↑	↓↑	↓↑	↑	↓
Canales de potasio		↑	↑	↑	↑
Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	↓		↓	↓	
Fosfolipasa C/ IP3	↑	↑	↑	↑	↓↑
Fosfolipasa A2				↑	

**Tabla 2.** Relación de los receptores de somatostatina (sst1-5) con distintas señales intracelulares (Cervia & Bagnoli, 2007; Patel, 1999; Schindler et al., 1996).

### 3.5. Función

La cortistatina (-14 y -29) comparte algunas propiedades biológicas con la somatostatina: ambos inducen una depresión en la actividad neuronal de las células piramidales de rodajas de hipocampo, aunque con distinta cinética (de Lecea et al., 1996). El efecto de la cortistatina-14 se desarrolla más lentamente alcanzando un máximo a los 6-8 minutos tras el inicio de la respuesta (Schweitzer et al., 2003). La hiperpolarización provocada por la cortistatina o la somatostatina se

debe probablemente al aumento de la amplitud de la corriente M a través de los canales de potasio dependientes de voltaje (que pueden ser cerrados por la acetilcolina) (de Lecea et al., 1996; Spier & de Lecea, 2000). Estos resultados parecen indicar que la cortistatina y la somatostatina inducen, de forma similar, un aumento en la conductancia de potasio en las neuronas del hipocampo mediada, muy probablemente, por los receptores de somatostatina (de Lecea, 2007).

Tanto la cortistatina como la somatostatina parecen reducir la actividad de las neuronas excitatorias glutamatérgicas. La administración de cortistatina-14 o de somatostatina-14 produce una reducción del potencial postsináptico excitatorio evocado mediado por los receptores de glutamato en CA1, pero no afecta al potencial postsináptico inhibitorio (Tallent & Siggins, 1997). La aplicación de cortistatina-14 en ratas produce una disminución en la actividad de las células piramidales de CA1 inducida por pulsos de NMDA. En cultivos de neuronas de hipotálamo, la cortistatina-14 y la somatostatina-14 inhiben las respuestas inducidas por el glutamato, probablemente a través de la activación de sst2 (Vasilaki et al., 1999).

Sin embargo, y a pesar de las importantes homologías entre la cortistatina y la somatostatina, algunos efectos de la cortistatina en el sistema nervioso central son diferentes a los de la somatostatina.

(1) La cortistatina antagoniza los efectos de la acetilcolina en medidas de excitabilidad cortical e hipocampal *in vivo* (de Lecea et al., 1996). Sin embargo, la somatostatina promueve la liberación de la acetilcolina y potencia las respuestas frente a este neurotransmisor (Araujo et al., 1990; de Lecea et al., 1996; Mancillas et al., 1986).

También se ha demostrado que la cortistatina está relacionada con la regulación del sueño. La concentración de preprocortistatina es menor al final del periodo de luz y mayor durante el periodo de oscuridad cuando los ratones son más activos (Bourgin et al., 2007). La expresión de preprocortistatina aumenta en condiciones de privación de sueño pero la privación de sueño REM no le afecta (Bourgin et al., 2007). La cortistatina (-14 y -17) inyectada en el cerebro de ratas induce una reducción en la actividad locomotora (Criado et al., 1999) y un aumento en el número de ondas de baja frecuencia en la corteza cerebral (1-4 Hz) y en la duración del sueño SWS sin afectar significativamente al sueño REM (de Lecea et al., 1996; Fukusumi et al., 1997). Sin embargo, se ha visto que la administración de somatostatina-14 favorece la hiperactividad (Rezek et al., 1976) y el sueño REM (Danguir, 1986).

Siguen sin conocerse los mecanismos exactos a través de los cuáles la cortistatina induce el sueño. Una posibilidad sería que la cortistatina-14 potenciase la actividad intrínseca de las neuronas corticales a través de la inhibición directa (hiperpolarización) de las neuronas principales (de Lecea et al., 1996). Además, la liberación regulada de la cortistatina-14 en el momento apropiado del ciclo circadiano podría antagonizar los efectos excitatorios de la

acetilcolina promoviendo el sueño (Bourgin et al., 2007). Por último, la cortistatina-14 podría promover el sueño SWS induciendo la sincronización de los EEGs probablemente a través de la activación de los canales H (Schweitzer et al., 2003). Estos canales, dependientes de voltaje, se localizan en las interneuronas GABAérgicas y controlan el potencial de membrana en reposo (Lupica et al., 2001; Maccaferri & McBain, 1996). La cortistatina-14, a diferencia de la somatostatina-14, promueve la actividad de hiperpolarización de los canales H por conductancia catiónica, en rodajas de hipocampo (Schweitzer et al., 2003). Se ha descrito que la activación de estos canales induce una despolarización en las células tálamo-corticales que causa un periodo refractario entre ondas (Luthi & McCormick, 1998). La activación y la posterior desactivación de los canales H en las células tálamo-corticales parecen ser un mecanismo clave para la inducción de oscilaciones sincronizadas. Por tanto, la activación de los canales H por la cortistatina-14 en las redes neuronales de la corteza podría tener un papel relevante en la regulación de la actividad sincrónica celular que caracteriza al sueño SWS.

(2) La cortistatina-14 presenta efectos neuroprotectores y anticonvulsivos. La administración de cortistatina-14 parece proteger de la muerte neuronal inducida por el ácido kaínico (Braun et al., 1998) o por la isquemia (Rauca et al., 1999). Su administración evita las convulsiones inducidas por la inyección de ácido kaínico en cerebros de rata (Braun et al., 1998). El ácido kaínico incrementa enormemente la actividad del hipocampo e induce muerte celular en el hipocampo por excitotoxicidad. De igual forma, la administración de somatostatina-14 o sus análogos (octreotide) induce una disminución en el número de convulsiones (Perez et al., 1995; Vezzani et al., 1991). Además, se ha visto que la epilepsia en humanos y diversos modelos animales está relacionada con la pérdida específica de interneuronas que expresan somatostatina en el giro dentado (revisado en (Tallent & Qiu, 2007)).

(3) La cortistatina-14 está implicada en la plasticidad neuronal, puesto que se ha visto que la sobre-expresión de la cortistatina-14 en ratones transgénicos produce alteraciones en la formación del LTP hipocampal y el aprendizaje, debido a su efecto inhibitorio sobre las neuronas del hipocampo (Tallent et al., 2005). Además, la inyección intraventricular de cortistatina-14 en ratones justo después de un periodo de entrenamiento reduce la retención de la memoria de una actividad aprendida (Flood et al., 1997). El aumento en la actividad GABAérgica está asociado con problemas en la retención de la memoria y, por el contrario, el aumento en el recambio de acetilcolina o de la actividad de sus receptores con una mejor retención (Bartus et al., 1980; Brioni et al., 1990; Castellano & McGaugh, 1991; Chrobak et al., 1989). El efecto de la cortistatina también podría estar mediado por la reducción de la función post-sináptica del receptor de NMDA de glutamato (Tallent & Siggins, 1997).



---

## Objetivos



En esta tesis, nos hemos propuesto estudiar distintos factores que podrían contribuir a la progresión de la EA. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudio de la posible toxicidad de la proteína tau extracelular. Si se observa un efecto, determinar el mecanismo molecular a través del cuál la proteína tau es tóxica para las células e identificar la región de la molécula de tau responsable de la muerte neuronal.
2. Efecto de la cortistatina en los niveles de fosforilación de tau utilizando los ratones que no expresan cortistatina. Realizar este trabajo en ratones de distintas edades.
3. Estudio del posible efecto de la cortistatina y de la somatostatina sobre la fosforilación de tau en cultivos primarios de neuronas corticales murinas. Si procede, identificación del/de los receptor/es responsable/s de dicho efecto y de la/s proteína/s quinasa/s responsable/s.



---

## Materiales y Métodos



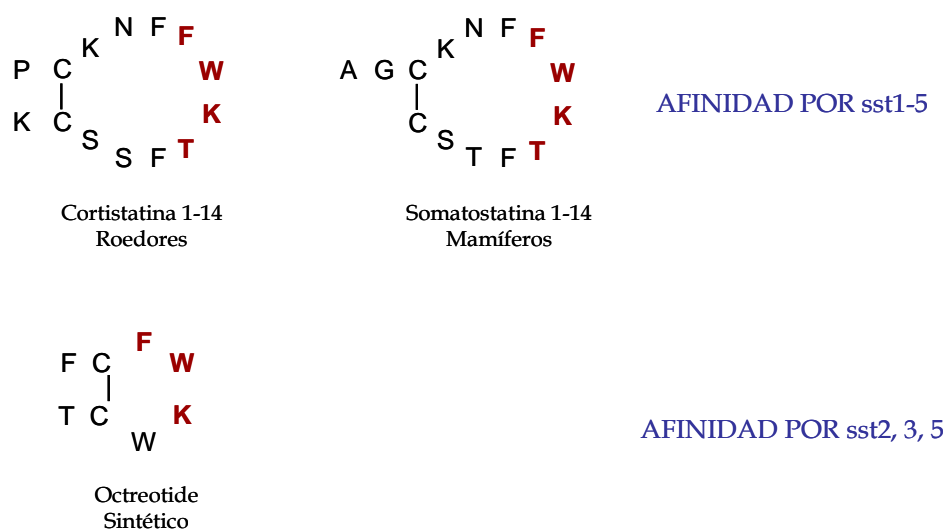
## 1. MATERIALES

### 1.1. Reactivos

Los proveedores de los reactivos y de los productos químicos de uso general empleados en el desarrollo de este trabajo fueron: Merck (Barcelona, España), Sigma-Aldrich (San Louis, MO, E.E.U.U.) y Gibco (Carlsbad, CA, E.E.U.U.).

La cortistatina (CST-14) acoplada a fluoresceína (Fluo-cortistatina) se sintetizó en SynPep (Dublin, CA, E.E.U.U.). La fluoresceína está unida a la lisina 3 de la cortistatina porque la prolina exocíclica situada en el extremo amino-terminal del péptido es esencial para su unión y actividad específicas (Criado et al., 1999). La estructura y la integridad del péptido fueron comprobadas por espectrometría de masas en el servicio de química de proteínas de *The Scripps Research Institute* (La Jolla, CA, E.E.U.U.). La Fluo-cortistatina fue amablemente cedida por el Dr. de Lecea (Universidad de Stanford, CA, E.E.U.U.).

La somatostatina (SRIF-14), el octreotide (OCT), el óxido de fenilarsina (PAO), la acetilcolina (ACh) y los antagonistas de receptores colinérgicos (hexametonio, atropina, pirenzepina, galamina y 4-DAMP) provienen de Sigma-Aldrich (San Louis, MO, E.E.U.U.). La cortistatina (CST-14) y el Ro 31-8220 son de Neomps (Strasbourg, Francia) y de Roche (Basel, Suiza) respectivamente. El DAPI es de Calbiochem (San Diego, CA, E.E.U.U.). En la figura 5 se detalla la estructura de la cortistatina, la somatostatina y el octreotide utilizados en esta tesis doctoral.



**Figura 5.** Estructura cíclica de la cortistatina (1-14), la somatostatina (1-14) y el octreotide. La secuencia responsable de la unión a los receptores de somatostatina (sst1-5) aparece en rojo. La cortistatina y la somatostatina se unen con igual afinidad a sst1-5, en cambio, el octreotide se une preferentemente a sst2, 3 y 5.

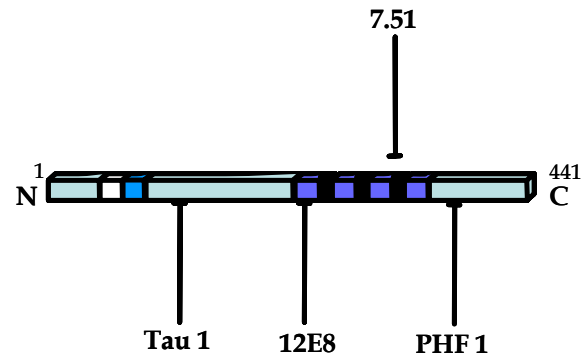
## 1.2. Anticuerpos

Las tablas 3 y 4 recogen los anticuerpos primarios y secundarios empleados en esta tesis así como sus proveedores y las diluciones utilizadas para el análisis por *western blot* (WB) y por inmunofluorescencia (IF). La figura 6 detalla la localización de los epítomos de los anticuerpos frente a tau.

<i>Nombre</i>	<i>Tipo</i>	<i>Epítomo</i>	<i>Proveedor</i>	<i>Dilución WB (v/v)</i>	<i>Dilución IF (v/v)</i>
<b>Anti-<math>\beta</math>-actina</b>	Monoclonal de ratón	$\beta$ -actina	Sigma-Aldrich (San Louis, MO, E.E.U.U.)	1/5000	1/5000
<b>Anti-HA (clon 12CA5)</b>	Monoclonal de ratón	HA (secuencia no peptídica (YPYDVPDYA) derivada de la proteína hemaglutinina de influenza)	Servicio de Microscopía Óptica y Confocal del CBMSO (Madrid, España)	1/2000	1/2000
<b>Anti-<math>\beta</math>-tubulina</b>	Monoclonal de ratón	$\beta$ -tubulina	Sigma-Aldrich (San Louis, MO, E.E.U.U.)		1/1000
<b>Anti-M1</b>	Policlonal de conejo	Receptor muscarínico M1	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, E.E.U.U.)		1/1000
<b>PHF 1</b>	Monoclonal de ratón	Tau P-Ser396/404	Dr. Davies (Albert Einstein College, NY, E.E.U.U.) (Greenberg et al., 1992; Otvos et al., 1994)	1/100	
<b>tau 1</b>	Monoclonal de ratón	Tau noP-Ser195/198/199/202	Dr. Binder (MGC, Illinois, E.E.U.U.)	1/1000	1/1000
<b>12E8</b>	Monoclonal de ratón	Tau P-Ser262 (Tau P-Ser356)	Dr. Seubert (Elan Pharmaceuticals, SF, E.E.U.U.) (Seubert et al., 1995)	1/1000	1/10 <sup>5</sup>
<b>7.51</b>	Monoclonal de ratón	Región de unión a tubulina	Dr. Wishik (Cambridge, Reino Unido) (Novak et al., 1991)	1/100	
<b>334</b>	Policlonal de conejo	Región carboxilo terminal de la isoforma $\beta$ 3 de tubulina neuronal	(Diaz-Nido et al., 1990)		1/1000

**Tabla 3.** Anticuerpos primarios utilizados en *western blot* (WB) y en inmunofluorescencia (IF) con sus diluciones respectivas. La numeración de los residuos de tau se establece en base a la isoforma de tau de mayor longitud en el SNC (expresando los exones 2, 3 y 10) (Goedert et al., 1989b).





**Figura 6.** Localización de los anticuerpos frente a tau utilizados. Se distinguen, en la parte de debajo de la figura, los anticuerpos dependientes del estado de fosforilación (tau-1, 12E8 y PHF1) y, en la parte de arriba, el anticuerpo independiente del estado de fosforilación (7.51).

<i>Nombre</i>	<i>Tipo</i>	<i>Proveedor</i>	<i>Dilución WB (v/v)</i>	<i>Dilución IF (v/v)</i>
<b>Anti-conejo</b>	Cabra-anti-conejo	Dako (Glostrup, Dinamarca)	1/2000	
<b>Anti-ratón</b>	Conejo-anti-ratón	Dako (Glostrup, Dinamarca)	1/2000	
<b>Alexa-488</b>	Cabra-anti-conejo	Invitrogen (Carlsbad, CA, E.E.U.U.)		1/500
<b>Alexa-555</b>	Cabra-anti-conejo	Invitrogen (Carlsbad, CA, E.E.U.U.)		1/500

**Tabla 4.** Anticuerpos secundarios utilizados en *western blot* (WB) y en inmunofluorescencia (IF) con sus diluciones respectivas.

## 2. MÉTODOS

### 2.1. Mantenimiento de las distintas cepas de ratones

En este trabajo, se utilizaron ratones silvestres C57BL6 de Harlan (Barcelona, España) y distintas cepas de ratones modificados genéticamente que no expresan los siguientes genes: cortistatina (CST -/-), sst2 (sst2 -/-), sst4 (sst4 -/-) y sst2/4 (sst2/4 -/-) (Videau et al., 2003). Las diferentes líneas se cruzaron con ratones C57BL6 (N9).

Los ratones se estabularon en el animalario del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (Madrid, España) en un ambiente de temperatura controlada con un ciclo luz/oscuridad de 12/12 horas con comida y agua disponibles *ad libitum*.

Todos los procedimientos llevados a cabo fueron aprobados por el comité del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (UAM-CSIC, Madrid, España).

### 2.2. Cultivos celulares

#### 2.2.1. Células SH-SY5Y, HEK-293 y COS-7: mantenimiento, transfección y tratamiento

Durante el desarrollo de este trabajo se usaron las siguientes líneas celulares: las SH-SY5Y de neuroblastoma humano (Biedler et al., 1978), las HEK-293 de riñón de embrión humano y las COS-7 de fibroblastos de riñón de mono verde africano (Gluzman, 1981). Estas células crecieron en un medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal, 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato, 100 U/mL de penicilina y 100 U/mL de estreptomycin en una atmósfera humedecida con 5% de CO<sub>2</sub>/95% aire a 37°C.

Las células HEK-293 y COS-7 se transfectaron de forma transitoria con plásmidos compuestos por el vector pcDNA 3.1 usando Lipofectamina 2000 (ambos de Invitrogen, Carlsbad, CA, E.E.U.U.) según las instrucciones del fabricante. Las placas con las células control se transfectaron, en las mismas condiciones, con el vector vacío pcDNA 3.1. Este vector se expresa en células de mamíferos puesto que contiene el promotor de citomegalovirus (CMV).

En el caso de las HEK-293 se emplearon tres tipos de plásmidos con distintos insertos de cDNA: la mayor isoforma humana de tau expresada en el SNC, los receptores murinos sst2 y sst4. Las células HEK-293 se transfectaron con distintas combinaciones de plásmidos: (1) con tau, (2) con tau y con sst2, (3) con tau y con sst4 y, por último, (4) con los tres plásmidos (tau, sst2 y sst4).

Para transfectar las COS-7 se sembraron en cubre-objetos tratados previamente con polilisina (100 µg/mL). En este caso, se utilizaron dos tipos de plásmidos: unos que contienen el cDNA de los receptores muscarínicos humanos M1 y otros, con M3 (UMR cDNA Resource Center, Missouri, MO, E.E.U.U.). El epítipo de ambos, situado en la zona amino-terminal, consiste en tres repeticiones de una secuencia no peptídica (YPYDVPDYA) derivada de la proteína hemaglutinina de influenza (3 x HA). Las células se transfectaron con M1, con M3 o con ambos plásmidos. Tras 24 horas, se fijaron para inmunofluorescencia o se procesaron para estudiar los niveles de calcio intracelular.

Los tratamientos de las células HEK-293 se detallan a continuación. Primero, se lavaron dos veces con PBS (Composición: 150 mM NaCl, 50 mM fosfato sódico, pH 7.4) y se incubaron en presencia de medio DMEM sin suero durante 2 horas. Las células HEK-293, previamente transfectadas de forma transitoria, se trataron por triplicado con distintas concentraciones (5, 50, 200 y 500 nM) de cortistatina durante 30 minutos o de somatostatina durante 5 minutos. Los extractos proteicos se analizaron mediante *western blot* como se detalla más adelante. También se purificó RNA.

Las SH-SY5Y se utilizaron para el estudio de la movilización intracelular de calcio, extracción de RNA y viabilidad celular siguiendo los protocolos descritos en otras secciones de del apartado de Métodos.

### **2.2.2. Cultivos primarios de neuronas de corteza o de hipocampo de ratón**

Siguiendo el protocolo descrito en *Banker et al.* (Banker & Cowan, 1977), el tejido hipocampal o cortical obtenido a partir de crías de ratón C57BL6 recién nacidas (P0-P1) se disoció con papaína (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, E.E.U.U.). Las células se sembraron en placas recubiertas con 100 µg/mL de polilisina y 10 µg/mL de laminina a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/placa p35 y cultivadas en medio Neurobasal (NB; Gibco, Carlsbad, CA, E.E.U.U.) con 10% (v/v) de suero de caballo, 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato, 100 U/mL de penicilina y 100 U/mL de estreptomycin. Tres horas después, el medio anterior se sustituyó por otro medio NB con 1% (v/v) de B27 (Gibco, Carlsbad, CA, E.E.U.U.), 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato, 100 U/mL de penicilina y 100 U/mL de estreptomycin. Para las neuronas de hipocampo, se utilizó el medio anterior suplementado además con 1% (v/v) de N2 (Gibco, Carlsbad, CA, E.E.U.U.). Las células se mantuvieron en una atmósfera humedecida con 5% de CO<sub>2</sub>/95% aire a 37°C y la mitad del medio de cultivo se reemplazó cada 2-3 días.

Los cultivos de células hipocampales o corticales de 1, 2, 3 o 7 días in vitro (DIV) se utilizaron para analizar la movilización intracelular de calcio.

Los experimentos para estudiar el efecto de los agonistas de receptores de somatostatina se realizaron en cultivos corticales después de 8 DIV cuando estos receptores parecen ser funcionales (Heidet et al., 1990; Stroh et al., 2000). Tras dos lavados con PBS, las células se incubaron en un medio NB sin suero y, 2 o 6 horas después, se añadieron al medio de cultivo los diferentes compuestos a las concentraciones y los tiempos indicados para cada tratamiento realizado por triplicado: (1) 5, 50, 100 o 500 nM de cortistatina de 5 a 30 minutos, (2) 50 nM de somatostatina de 5 a 30 minutos, (3) 5, 50, 100 o 500 nM de octreotide de 5 a 30 minutos, (4) 10  $\mu$ M de Ro 31-8220 90 min, (5) 10  $\mu$ M de Ro 31-8220 60 min + 50 nM de cortistatina 30 min. En los experimentos control, se añadió el vehículo del tratamiento.

### **2.3. Western blot (WB)**

Los extractos de proteínas de tejido cerebral se prepararon a partir de disecciones de corteza, hipocampo y resto de cerebro de ratones silvestres C57BL6 y CST -/-. El tejido se homogeneizó en un homogeneizador (*potter*) de vidrio/vidrio con tampón de extracción en hielo (Composición: 20 mM Hepes pH 7.4, 100 mM NaCl, 20 mM NaF, 5 mM EDTA y 1% (v/v) Tritón TX-100 suplementado con inhibidores de fosfatasa (30 mM glicerofosfato, 5 M pirofosfato, 1  $\mu$ M ácido okadaico) y con inhibidores de proteasas (2 mM fenilmetanelsulfonilfluoruro, 10  $\mu$ g/ml leupeptina, 10  $\mu$ g/ml aprotinina y 10  $\mu$ g/ml pepstatina; Roche, Basel, Suiza). Se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante descartando el sedimento. El contenido proteico se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Tras el tratamiento, la extracción de proteínas de las células de los cultivos se realizó directamente en tampón de electroforesis (Composición: 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 2% (p/v) SDS, 0.1% (v/v) azul de bromofenol, 10% (v/v) glicerol) suplementado con los inhibidores de fosfatasa y de proteasas anteriores).

En todos los casos, los extractos de proteínas se hirvieron durante 10 minutos en tampón de electroforesis para después ser cargados en geles de poliacrilamida al 10% (p/v) en presencia de SDS (SDS-PAGE). Una vez separadas las proteínas, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Keene, NH, E.E.U.U.) según el método de Towbin (Towbin et al., 1979). Para comprobar la eficiencia de la transferencia, las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau. Más tarde, las membranas se bloquearon para su unión no específica con 5% (p/v) de leche en polvo en PBS con 0.05% (v/v) de Tween-20 durante 30 minutos. Se procedió a la

incubación con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo (tabla 3) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron tres veces con PBS Tween-20 (0.05% (v/v)) y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (1/2000) acoplado a peroxidasa (DAKO, Glostrup, Dinamarca) durante 45 minutos (tabla 4). Tras varios lavados con PBS Tween-20 (0.05% (v/v)), la detección de las bandas inmunoreactivas se realizó con el sistema ECL (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, E.E.U.U.).

Finalmente, la cuantificación del grado de inmunoreactividad de las proteínas, en unidades arbitrarias, se realizó mediante escaneo y posterior densitometría de las películas autorradiográficas usando el programa Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, E.E.U.U.). Los niveles de fosforilación de la proteína tau se calcularon normalizando los datos con los niveles de tau total determinados por el anticuerpo 7.51.

## **2.4. Inmunofluorescencia**

Esta técnica se utilizó en las células siguientes, crecidas sobre cubre-objetos:

- las COS-7 transfectadas con M1 o M3
- las HEK-293 transfectadas con combinaciones diferentes de los plásmidos de tau, sst2 y sst4
- los cultivos primarios de hipocampo y de corteza

Las células se fijaron con 4 % (p/v) de paraformaldehído en PBS suplementado con 5 mM de  $MgCl_2$  durante 10 minutos a 37 °C. Tras tres lavados con PBS, los cubre-objetos se incubaron con diferentes soluciones a temperatura ambiente: PBS con 0.1 % (v/v) de Tritón X-100 (15 min), 1M de glicina en PBS (30 min) y solución de bloqueo (1 % (p/v) de seroalbúmina bovina (BSA) en PBS, 45 min). Los cultivos estuvieron en presencia del anticuerpo primario correspondiente para cada caso durante 1 hora (tabla 3). Tras dos lavados de PBS, se añadió el anticuerpo secundario en solución de bloqueo durante 45 minutos (tabla 4). En algunos experimentos, se tiñeron los núcleos con DAPI (1/10<sup>5</sup>, 5 min). Seguidamente, los cubre-objetos se montaron en glicerol:PBS (1:1) o FluorSave (Calbiochem, San Diego, CA, E.E.U.U.). Las muestras se visualizaron en distintas sesiones utilizando los microscopios confocales modelo Axiovert 200M, Axioskop 2 (Carl Zeiss International, Thornwood, NY, E.E.U.U.) y Leica SP2 AOBS (Leica, Wetzlar, Alemania). Las imágenes se adquirieron de forma secuencial con ayuda del programa informático asociado y se procesaron utilizando el programa Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, CA, E.E.U.U.).

## **2.5. Internalización de Fluo-cortistatina en cultivos primarios de corteza murina**

Los ensayos de internalización de Fluo-cortistatina se realizaron en cultivos corticales después de 8 DIV. Las células se crecieron en un medio NB sin suero durante 2 horas y, después, se realizaron los tratamientos siguientes: (1) 1-5  $\mu$ M Fluo-cortistatina 1 o 30 min, (2) 100  $\mu$ M cortistatina 10 min + 1  $\mu$ M Fluo-cortistatina 30 min, (3) 100  $\mu$ M somatostatina 10 min + 1  $\mu$ M Fluo-cortistatina 30 min, (4) 1  $\mu$ M PAO 30 min + 5  $\mu$ M Fluo-cortistatina 30 min. En las células control, se añadió el mismo volumen del vehículo del tratamiento en condiciones experimentales similares. Los compuestos empleados se diluyeron en agua a excepción del PAO que estaba diluido en dimetilsulfóxido (DMSO).

Después, se realizó una inmunofluorescencia con el anticuerpo primario 334 (tabla 3) y los núcleos se tiñeron con DAPI siguiendo el protocolo que se detalla en el apartado anterior. El recuento de las neuronas corticales en cultivo se realizó en campos seleccionados al azar a 40X (un área aproximada de 0.2 mm<sup>2</sup>) utilizando un microcopio de fluorescencia modelo Zeiss (Carl Zeiss International, Thornwood, NY, E.E.U.U.). Sólo se consideraron como células con Fluo-cortistatina internalizada las células con intenso marcaje verde. La proporción de células marcadas (vs. número total de células) se obtuvo contando 100-250 células totales por campo en los cubre-objetos incubados en presencia de Fluo-cortistatina a una concentración de 5  $\mu$ M durante 30 minutos (n = 5 cubre-objetos). El número de células totales se obtuvo contando los núcleos teñidos con DAPI. Para comparar los experimentos con Fluo-cortistatina (1  $\mu$ M, 30 min) con los de cortistatina o somatostatina (100  $\mu$ M, 10 min) + Fluo-cortistatina (1  $\mu$ M, 30 min), se contaron las células marcadas con la fluorescencia verde en 20 campos distintos (n = 4 cubre-objetos por condición).

## **2.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa**

La purificación del RNA, seguida de un tratamiento con DNasa, se realizó usando el *RNA Miniprep Kit* (Stratagene, La Jolla, CA, E.E.U.U.) según el protocolo del fabricante. El RNA se obtuvo a partir de las distintas líneas celulares (las HEK-293 transfectadas de forma transitoria, las SH-SY5Y y las COS-7) y de los cultivos primarios de corteza de 8 DIV.

Para evitar la proliferación de células no-neuronales en los cultivos corticales, se añadió 2.5  $\mu$ M de arabinofuranosilcitosina (Ara-C; Calbiochem, San Diego, CA, E.E.U.U.) tras 3 DIV. Los receptores de somatostatina no sólo se expresan en las neuronas sino que también lo hacen, aunque en menor medida, en las células gliales de roedores (Feindt et al., 1995; Heidet et al., 1990; Hosli & Hosli, 1994; Mentlein et al., 1990; van Calker et al., 1980).

Finalmente, la concentración y la pureza del RNA se comprobaron utilizando un espectrofotómetro modelo Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, E.E.U.U.).

El RNA (480 ng) se retro-transcribió como cDNA de simple cadena utilizando el *kit* de síntesis de cDNA (Roche, Basel, Suiza) según las instrucciones del fabricante. La reacción incluía 20 unidades de transcriptasa inversa del Virus de la mieloblastosis de ave (AMV), 0.2 µg/µL de *primers* hexanucleótidos y 0.08 µg/µL de *primers* oligonucleótidos (dT).

Usando el reactivo *SYBR Green* ( $n = 3$ ), detectamos los niveles de expresión de distintos genes:

- M1-5 en las SH-SY5Y y COS-7,
- sst1-5 en las neuronas corticales,
- tau, sst2 y sst4 en las células HEK-293 transfectadas de forma transitoria.

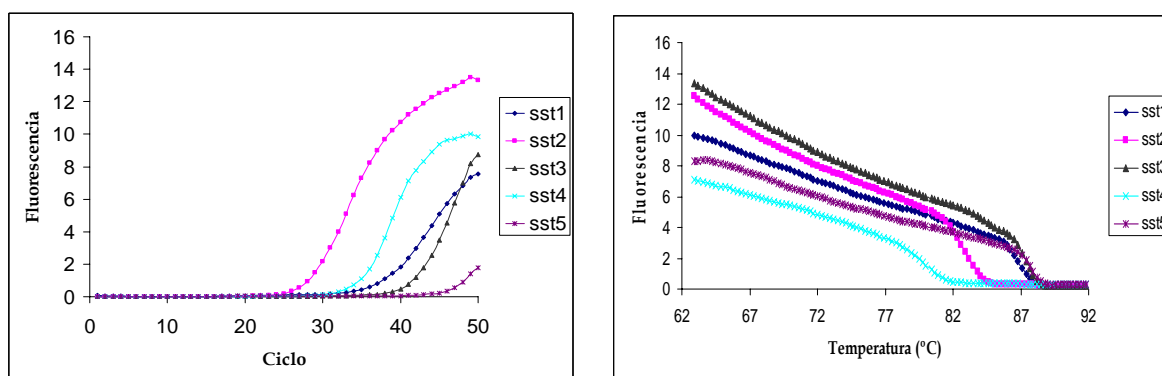
El *SYBR Green*, al igual que el bromuro de etidio, se une específicamente al DNA de doble cadena, y al hacerlo incrementa fuertemente su fluorescencia. Al unirse al DNA de doble cadena recién sintetizado en cada ciclo, este reactivo emite una fluorescencia proporcional a la concentración de DNA. La reacción de 10 µL de volumen total contenía: 1 µL de molde (cDNA, cDNA diluido (1:5), plásmido, DNA genómico o H<sub>2</sub>O), 5 µL de la mezcla de PCR de *SYBR Green* (Applied Biosystems, Foster City, CA, E.E.U.U.) y 150 nM de cada par de *primers*. Las secuencias de los *primers* utilizados en esta tesis y los genes específicos que amplifican aparecen en la tabla 5 (Cristiani et al., 2000). Los niveles de expresión de los genes estudiados se normalizaron con los de expresión de β-actina murina en el caso de los cultivos primarios y con los de β-actina humana en el caso de las líneas celulares.

El protocolo de amplificación consistió en un paso de 10 minutos a 95°C (activación de la Taq polimerasa) seguido de 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y de 1 minuto a 60°C (desnaturalización y anillamiento-extensión). Tras la amplificación, se obtuvo la curva de disociación aumentando progresivamente la temperatura de 60°C a 95°C (figura 7). La señal fluorescente se adquirió durante la fase de anillamiento por el sistema de detección de modelo ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, E.E.U.U.).

Para comprobar la especificidad de la reacción, se analizaron las curvas de disociación correspondientes para cada caso. Además, usamos distintos cDNA como moldes de los controles positivos: pituitaria de ratón para sst5, plásmidos para sst1-4 y DNA genómico de SH-SY5Y y COS-7 para M1-5. Las reacciones sin molde para cada amplificación se usaron como controles negativos. La media de los valores de los ciclos umbral ( $C_T$ ) de cada reacción, realizada por triplicado, se calculó teniendo en cuenta las muestras diluidas y no diluidas y se normalizó con los valores  $C_T$  del gen de β-actina correspondiente.

<i>Gen</i>	<i>Secuencia "sentido"</i>	<i>Secuencia "anti-sentido"</i>
$\beta$ -actina murina	GGCGCTTTTGACTCAGGATT	GGGATGTTTGCTCCAACCAA
$\beta$ -actina humana	CACACTGTGCCCATCTACGA	CTCCTTAATGTCACGCACGA
M1	ACCTCTATACCACGTACCTG	TGAGCAGCAGATTCATGACG
M2	ACCTGTGGTGTGTGACCTTT	GCTTGACTGGGTAGGTCAGA
M3	CATCATGAATCGATGGGCCT	GGCCTCGTGATGGAAAAGTA
M4	CAGTTTGTGGTGGGTAAGCG	GTACAGCACCGTCATGATGA
M5	GATGAGTGCCAGATCCAGTT	GACAGTAGAGGATGGTCATG
sst1	TATTGCTGATGAGCTGCTCATGCTC	TCCACACTAAGCACAGTCAGACAGT
sst2	ATCAGCCCCACCCCAGCCCTGAA	GCAAAGAACATTCTGGAAGCTCTTC
sst3	CAAGGAGATATACCAGGACTTGGGA	TAGGACACTGGACTGTCCTGCAGAA
sst4	AACAACGGAGGCGCTCAGAGAAGAA	TCGAGGCTGGTGACAAACAGGTTCA
sst5	GGGCTGGGGCACCTGCAACCTGA	GACAGGACCACCACAAAGAAGTAGA
Tau	GCGGATCCATATGGGGGATCGCAGC	CCGAATTCTTAGGGCACGGGGG

**Tabla 5.** Parejas de *primers* utilizados para amplificar los genes  $\beta$ -actina murina y humana, M1-5, sst1-5 y tau. Se detalla la secuencia (5'-3') de cada *primer* utilizado.



**Figura 7.** Ejemplo de amplificación de los receptores de somatostatina (sst1-5) en el panel de la derecha. A la izquierda, curvas de disociación de los distintos genes.



## **2.7. Purificación de DNA genómico**

El DNA genómico de las COS-7 se extrajo usando el sistema de purificación Wizard Plus SV (Promega, Wisconsin, E.E.U.U.).

En el caso de las células SH-SY5Y, se siguió un protocolo de alta concentración de sales. Primero, se añadió un tampón para lisis de núcleos (1% (v/v) TE pH 8.0, 0.4 M NaCl y 2 mM EDTA) al precipitado celular y las células se centrifugaron durante 10 minutos a 4°C (12000 rpm). El precipitado obtenido se resuspendió en el tampón de lisis anterior suplementado con 0.3 mg/mL de proteinasa K (Merck, Barcelona, España) y 1% (p/v) de SDS. Tras una incubación a 45°C durante toda la noche, se añadió a la muestra 6 M de NaCl y se centrifugó (15 min, 3000 rpm). El sobrenadante se centrifugó varias veces hasta que aparecía transparente (sin sales). Para precipitar el DNA, se añadió al último sobrenadante 3 M de acetato sódico (pH 5.2) e isopropanol frío. El DNA se transfirió a un nuevo tubo con 70% (v/v) de etanol y se centrifugó (30 min, 14000 rpm). Finalmente, se resuspendió el precipitado en agua.

El DNA genómico sirvió de molde de la amplificación específica de M1-5 y la concentración de los productos de PCR se midió en el espectrofotómetro modelo Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, E.E.U.U.).

Los microgramos de DNA doble cadena se convirtieron a picomoles:  $\text{pmol} = \mu\text{g} \times 10^6 \text{ pg} / 1 \mu\text{g} \times 1 \text{ pmol} / 660 \text{ pg} \times 1 / N$  (N, tamaño del fragmento amplificado en pares de bases (pb): 122, 128, 128, 132, 103 y 162 pb para M1-5 y  $\beta$ -actina humana respectivamente). Se realizaron las distintas rectas patrones para M1-5 usando diluciones seriadas (diez veces) en tRNA de levadura (110 ng/ $\mu\text{L}$ , Roche Applied Science, Basel, Suiza) de los productos de PCR correspondientes a partir de  $10^{-2}$  pmol.

## **2.8. Determinación fluorimétrica del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular con Fura-2**

Se determinó el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre en distintos tipos celulares mediante un seguimiento fluorimétrico continuo empleando Fura-2 como indicador fluorescente (Diaz-Hernandez et al., 2001a; Diaz-Hernandez et al., 2001b). Este compuesto se une al  $\text{Ca}^{2+}$  específicamente y, al hacerlo, aumenta su emisión de fluorescencia a 510 nm (figura 8) al mismo tiempo que se desplaza su espectro de excitación hacia el UV, cambiando el máximo de excitación de 380 (solución de Fura-2 libre de calcio) a 340 nm (Fura-2 saturado de calcio).

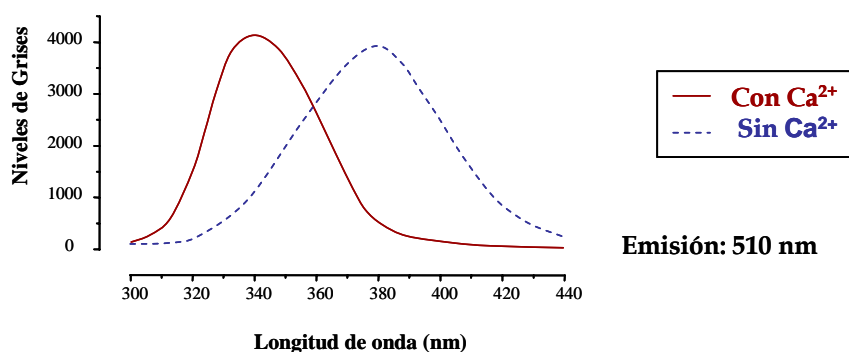
Estas determinaciones se realizaron en cultivos de neuronas hipocámpales y corticales, de SH-SY5Y y de COS-7 transfectadas de forma transitoria. Las células se lavaron en tampón de perfusión compuesto por: 122 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 0.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5.0 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 mM glucosa y 20 mM TES a pH 7.4. Posteriormente, se incubaron con la sonda

Fura-2 acetometil éster (Fura-2 AM) a una concentración de 7.5  $\mu\text{M}$  durante 30 minutos a 37°C. Este periodo facilita la hidrólisis del Fura-2 AM. Es un compuesto esterificado que, al ser liposoluble, atraviesa fácilmente la membrana plasmática. Una vez en el interior celular, el Fura-2 AM es hidrolizado por esterasas celulares inespecíficas que liberan Fura-2 (ácido), compuesto que al perder su liposolubilidad, queda retenido en la célula.

Tras varios lavados con medio fresco, los cubre-objetos se montaron en una cámara de perfusión en un microscopio modelo Nikon Eclipse TE-2000 (Nikon Corporation, Japón). La cámara se dotó de un flujo de entrada constante de tampón de perfusión termostatzado a 37°C (1.2 mL/min) y de una salida por aspiración mediante bomba de vacío. En todos los experimentos, se añadió, primero, acetilcolina a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  para comprobar si las células eran funcionales. Tras varios lavados, se detuvo el sistema de perfusión para realizar los tratamientos añadiendo los distintos compuestos al medio de la cámara. Los ensayos con 50  $\mu\text{M}$  de acetilcolina y 1  $\mu\text{M}$  de tau, en distintas formas, eran de 10 minutos. Para ensayar los antagonistas de los receptores muscarínicos, se pre-incubaron las células en presencia de los compuestos siguientes durante 5 minutos a diferentes concentraciones: 10  $\mu\text{M}$  de hexametonio, 100  $\mu\text{M}$  de atropina, 10  $\mu\text{M}$  de pirenzepina, 2  $\mu\text{M}$  de 4-DAMP y 2  $\mu\text{M}$  de galamina. Seguidamente, se añadió 50  $\mu\text{M}$  de acetilcolina o 1  $\mu\text{M}$  de distintas formas de tau durante 10 minutos. Al final de cada experimento, se aplicaron pulsos de acetilcolina a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  para confirmar la viabilidad del cultivo estudiado. Las células se visualizaron utilizando un objetivo de 40x.

Se excitaron las muestras alternativamente con luz de diferente longitud de onda (340 y 380 nm) mediante el uso de un monocromador de un ancho de banda de 10 nm (Optocan monochromator, Cairn, Faversham, Reino Unido) y la fluorescencia se midió a 510 nm. Sucesivamente, la cámara CCD Hamamatsu C-4880-80 (Hamamatsu, Japón) asociada al programa informático Metafluor 6.3r6 PC (Universal Imaging Corp., Cambridge, Reino Unido) tomó imágenes de 12 bit de las células. El tiempo de exposición fue de 150 ms para cada longitud de onda y el tiempo de cambio <5 ms.

Los registros mostrados representan la media de la intensidad lumínica que se produce en una región elíptica dibujada en el interior de cada célula. El valor de fluorescencia basal se restó a los datos obtenidos para cada longitud de onda. En este trabajo, los resultados se presentan como el ratio entre las señales de 340 y 380 nm ( $F_{340}/F_{380}$ ) que se obtienen al dividir la sucesión de imágenes obtenidas a las diferentes longitudes de onda. El cociente de fluorescencia  $F_{340}/F_{380}$  se calibró como  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  empleando la ecuación descrita en (Grynkiewicz et al., 1985) y se corrigió siguiendo el protocolo descrito en (Poenie, 1990).



**Figura 8.** Espectro de excitación de la sonda fluorescente Fura-2 en presencia y en ausencia de calcio.

## 2.9. Purificación de proteínas

En este trabajo, se utilizó la isoforma humana de tau 42 recombinante que contiene dos insertos amino-terminal (N) y cuatro repeticiones de unión a microtúbulos (R) (Goedert & Jakes, 1990). También se emplearon los fragmentos de tau siguientes: tau 2R (residuos 250-335 con la deleción de 274-304), 2N compuesto por la mitad amino-terminal de tau (residuos 1-251), 3R (residuos 250-367 con la deleción de 274-304), 3RC (residuos 250-441 con la deleción de 274-304) y tau<sub>391-407</sub> que comprende la región carboxilo-terminal de la proteína y la siguiente secuencia EIVYKSPVVS GDTSPRH (residuos 391-407) (Perez et al., 2001). La numeración de los residuos de tau se define según la nomenclatura de la isoforma de tau más larga (Goedert et al., 1989a; Goedert et al., 1989b). Los PHF se aislaron como detallan Greenberg y Davies (Greenberg & Davies, 1990) y se visualizaron por el microscopio electrónico Jeol modelo JEM1010 (Hernandez et al., 2002). Los fragmentos de tau se aislaron siguiendo el protocolo descrito en (Perez et al., 1996) y el péptido tau<sub>391-407</sub> se sintetizó y purificó según (Perez et al., 2001). Las proteínas purificadas se separaron en un gel de electroforesis y se tiñeron con azul de Coomassie. El contenido en tau se determinó mediante *western blot* usando el anticuerpo 7.51 frente a tau y posterior cuantificación por densitometría.

## 2.10. Ensayo de viabilidad

Se añadió al medio de cultivo de las SH-SY5Y el tau 42 a distintas concentraciones (1, 3, 5  $\mu$ M) durante 24 y 48 horas. Las células control se incubaron con el mismo volumen de vehículo. La viabilidad celular se midió usando el *kit* de la lactatodeshidrogenasa (LDH; Roche, Basel, Suiza) según las instrucciones del fabricante.

## 2.11. Test del reconocimiento de objeto

Trabajamos con ratones machos de más de un año de edad (12-14 meses) silvestres C57BL6 y CST -/-. Se siguió el protocolo del test de comportamiento descrito anteriormente (Engel et al., 2006; Ennaceur et al., 1997; Woolley et al., 2003). En resumen, los ratones se entrenaron durante 30 minutos en una caja de plástico con muros verticales opacos (73 x 33 x 25 cm). Al día siguiente, los animales se colocaron en la misma caja durante 10 minutos. Dos horas después, cada ratón se dejó durante 4 minutos en la caja sin objetos. Más tarde, se situó al animal durante 1 minuto en su jaula. La siguiente fase de familiarización fue en la caja durante 5 minutos en presencia de dos objetos idénticos (objetos A y B). Los dos objetos se colocaron en cada extremo del eje más largo de la caja, cada uno a 7 cm de la pared de la caja. Tras cada exposición, los objetos y la caja se limpiaron con etanol al 70% para eliminar las pistas olorosas. Dos horas después de la familiarización, se realizó la prueba del reconocimiento: cada ratón se dejó en la caja durante 5 minutos con un objeto antiguo (objeto A) y un objeto nuevo (objeto C). La posición del objeto C era la misma que la del objeto B en la fase de familiarización. Se consideró que los animales reconocían el objeto cuando su cabeza se situaba a menos de 2 cm del objeto. Se anotaron los tiempos ( $t_A$  y  $t_C$ ) que el ratón empleaba en explorar los dos objetos (objetos A y B). El índice de memoria (MI) se define como el ratio entre el tiempo empleado en explorar el nuevo objeto sobre el tiempo empleado en explorar ambos objetos,  $MI = [t_C / (t_A + t_C)] \times 100$ . Ese índice se utilizó para medir la memoria no-espacial.

## 2.12. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos empleados en esta tesis doctoral fueron: ANOVA seguida por un test Bonferroni *post hoc* (figura 20 A) y análisis de *t Student* (el resto de figuras).

Se utilizó el test de la *chi* cuadrado para comparar el número de células con Fluo-cortistatina internalizada en distintas condiciones experimentales: (1) Fluo-cortistatina (1  $\mu$ M, 30 min), (2) somatostatina (100  $\mu$ M, 10 min) + Fluo-cortistatina (1  $\mu$ M, 30 min) y (3) cortistatina (100  $\mu$ M, 10 min) + Fluo-cortistatina (1  $\mu$ M, 30 min). Se consideraron positivos los campos con 3 o más células con Fluo-cortistatina internalizada (área aproximada de cada campo: 0.2 mm<sup>2</sup>).

---

# Resultados



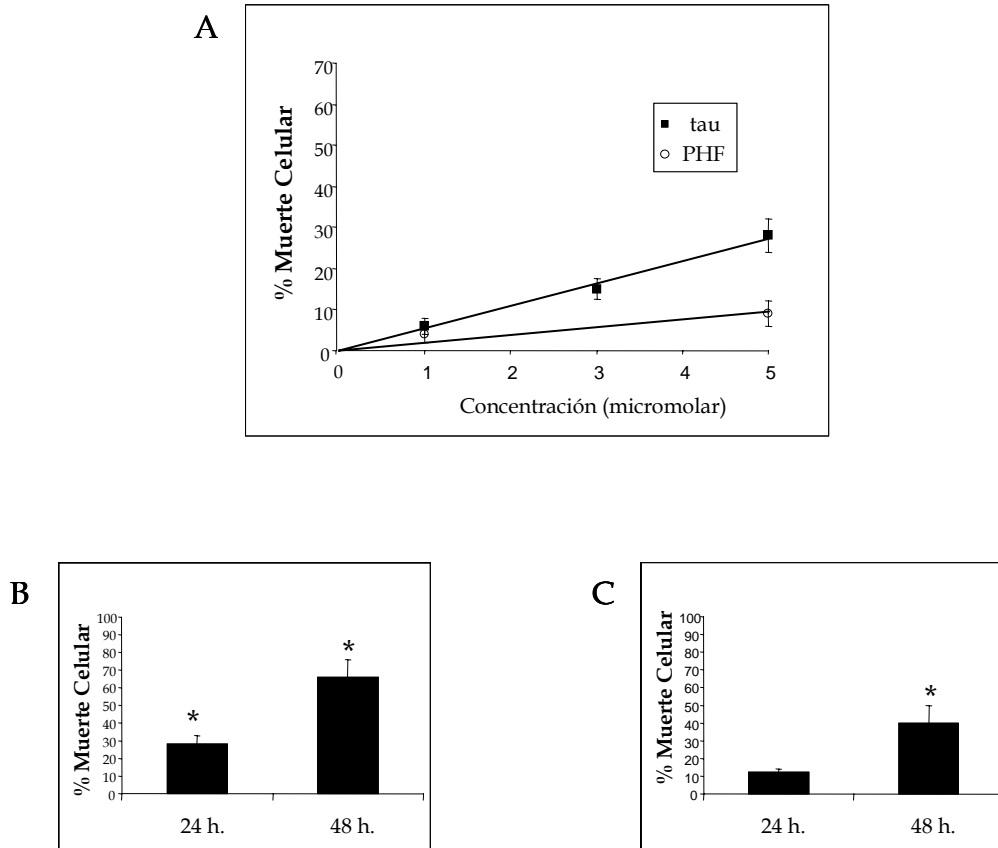
## **1. PAPEL DE TAU EN LA PROGRESIÓN DE LA EA**

### **1.1. La proteína tau extracelular produce muerte celular de las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y**

Como se indicó en la introducción, durante el desarrollo de la EA, los NFT se van formando según una secuencia invariable que correlaciona con el daño en estructuras concretas del cerebro (Braak & Braak, 1991). En este trabajo, nos planteamos la posibilidad de que el progreso de la EA pudiera depender de la toxicidad celular mediada por la presencia de tau extracelular. La proteína tau presente en el interior celular puede pasar al medio extracelular en el momento en que una neurona degenera. El tau extracelular podría ser tóxico para las células vecinas de un modo similar al observado en el caso del péptido  $\beta$ -amiloide extracelular. El péptido  $\beta$ -amiloide puede formar poros en las membranas de las células de neuroblastoma humano provocando la entrada de calcio hasta niveles tóxicos para la célula (Demuro et al., 2005).

Resultados previos del laboratorio indicaban que la proteína tau extracelular podría ser tóxica, cuando se añadía a cultivos celulares, y que dicha toxicidad podría estar relacionada con la presencia de receptores colinérgicos en las células cultivadas (Gomez-Ramos et al., 2006). Primero, para comprobar la posible toxicidad de tau extracelular, se realizaron experimentos de viabilidad añadiendo tau en forma monomérica y fibrilar (PHF) a células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en cultivo. Incubamos las células SH-SY5Y durante 24 horas en presencia de distintas concentraciones de tau en forma monomérica (1, 3, 5  $\mu$ M) o en PHF (1, 5  $\mu$ M). Medimos la muerte celular presente en las células SH-SY5Y tratadas y la comparamos con la de células control tratadas con el vehículo. La figura 9 A muestra que la exposición a tau en cualquiera de sus formas induce un aumento en la muerte celular y que este aumento se acentúa con concentraciones crecientes de tau. Además, comprobamos que la proteína tau en forma monomérica es más tóxica que en PHF.

También, estudiamos la toxicidad de tau en incubaciones de 48h cuando las células se trataban con una concentración alta de 5  $\mu$ M de tau en forma monomérica y en PHF. Comprobamos que, en ambos casos, la toxicidad de tau es mayor si los tratamientos se prolongan en el tiempo (figura 9 B-C).



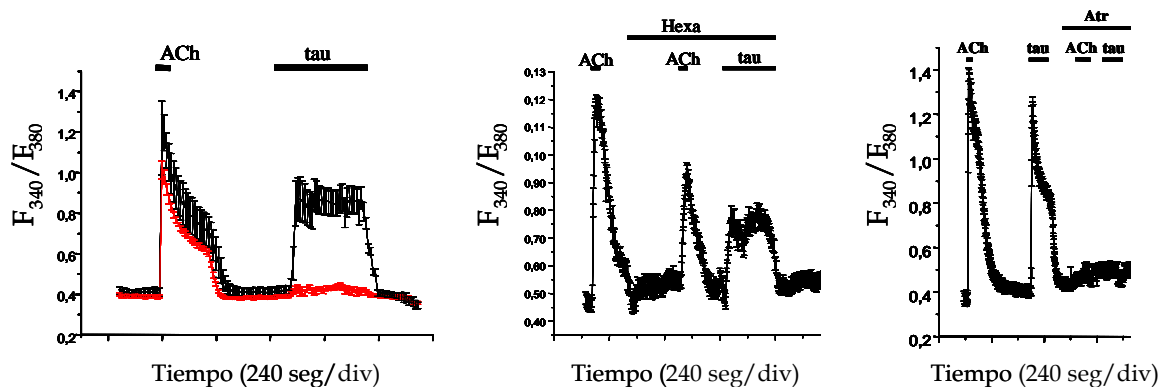
**Figura 9. La proteína tau extracelular es tóxica para las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en cultivo.** (A) Efecto de la adición de distintas concentraciones de tau en forma monomérica (tau) y en forma fibrilar (PHF) sobre la viabilidad de las SH-SY5Y. Las incubaciones fueron de 24h. (B) Viabilidad celular en presencia de 5  $\mu$ M de tau en forma monomérica durante 24h y 48h. Comparamos los resultados de las células control (tratadas con el vehículo) con los de las células con tau correspondientes a su respectivo periodo de incubación en cada caso (\*  $p < 0.05$ ). (C) Como en (B), pero el tratamiento se realizó con tau en PHF. En ambos experimentos, la concentración creciente de tau y la prolongación en el tiempo de su exposición agravan la toxicidad sobre las células.



## **1.2. La proteína tau altera la homeostasis de calcio intracelular de las SH-SY5Y a través de los receptores muscarínicos**

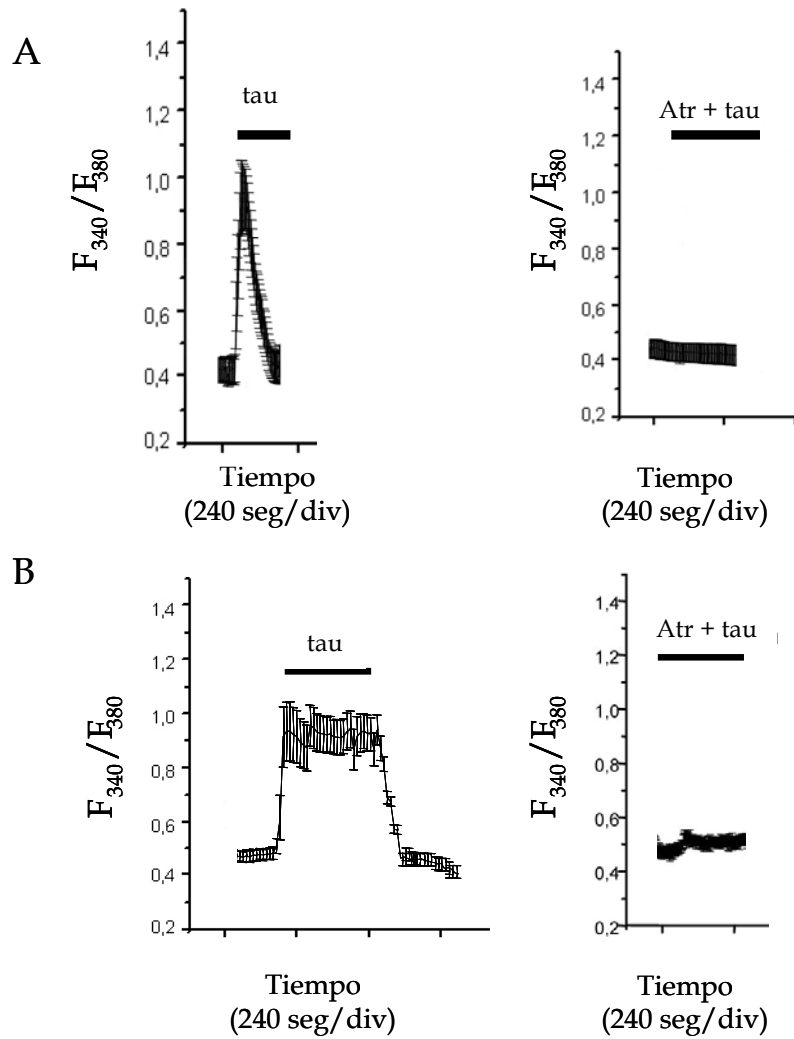
Para comprobar si la toxicidad de la proteína tau extracelular se debe a un aumento de calcio intracelular como se ha descrito para el péptido  $\beta$ -amiloide (Demuro et al., 2005), estudiamos el efecto de tau sobre los niveles de calcio intracelular de las células SH-SY5Y. Centramos este estudio y los posteriores, en el análisis de tau en forma monomérica puesto que vimos que era el más tóxico para las células en cultivo. La adición de 1  $\mu$ M de tau al medio de las SH-SY5Y, cargadas con Fura-2 AM, induce un aumento sostenido en los niveles de calcio intracelular (figura 10). Usamos tratamientos de 50  $\mu$ M de acetilcolina como control positivo de aumento de calcio intracelular. La figura 10 muestra que el efecto de tau sobre los niveles de calcio intracelular se prolonga más en el tiempo que el efecto de los tratamientos realizados con acetilcolina. Estos datos sugieren que la toxicidad de tau podría deberse a la mayor duración de su efecto sobre la movilización intracelular de calcio. Observamos que algunas de las células que muestran un aumento en los niveles de calcio intracelular en presencia de acetilcolina no lo hacen al añadir tau. Ésto se debe probablemente a que la composición de receptores no es la misma en todas las células. Por tanto, quisimos identificar el/los receptor/es responsable/s del efecto de tau sobre la movilización intracelular de calcio.

Nos planteamos que los receptores colinérgicos eran posibles mediadores de este efecto, como previamente había sido propuesto (Gomez-Ramos et al., 2006). Para ello, realizamos distintos experimentos en presencia de antagonistas de receptores colinérgicos. La figura 10 muestra que el incremento de los niveles de calcio intracelular inducido por tau también puede observarse en presencia de 10  $\mu$ M de hexametonio, un antagonista de los receptores nicotínicos. Sin embargo, este efecto no aparece cuando las células se pre-incuban con 100  $\mu$ M de atropina, un antagonista de los receptores muscarínicos (figura 10). Estos resultados sugieren que el aumento intracelular de calcio provocado por la proteína tau extracelular está mediado por los receptores muscarínicos.



**Figura 10.** La proteína tau activa a los receptores muscarínicos de SH-SY5Y induciendo un incremento en la concentración intracelular de calcio. Estos datos representan los cambios en la fluorescencia de Fura-2 con el tiempo. En todos los experimentos, las SH-SY5Y cargadas con Fura-2 se estimularon primero, con 50  $\mu$ M de acetilcolina (como control positivo) y 1  $\mu$ M de tau y seguidamente, con 1  $\mu$ M de tau y 50  $\mu$ M de acetilcolina en presencia de distintos antagonistas para los receptores colinérgicos: hexametonio (Hexa; 10  $\mu$ M; antagonista de los receptores nicotínicos) o atropina (Atr; 100  $\mu$ M; antagonista de los receptores muscarínicos). Las rectas de la parte superior de la gráfica indican los periodos de estimulación y las barras de error, la desviación estándar. Los datos presentados son la media de la respuesta de  $\geq 20$  células. En rojo, se muestran los datos de las células que responden a acetilcolina pero que no responden a tau.

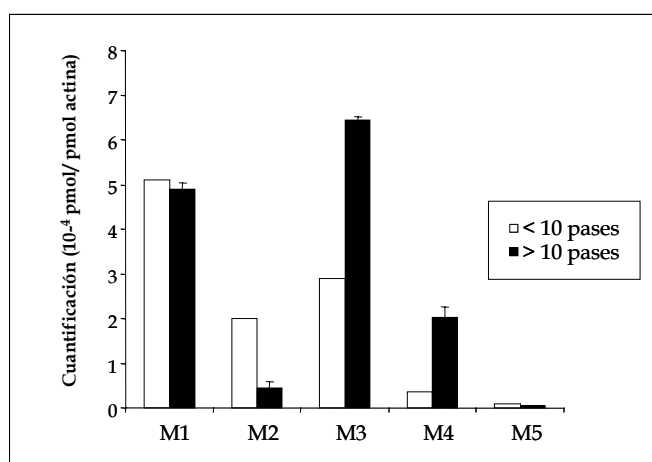
Más adelante, nos preguntamos si el número de pases de las células podría influir en el efecto de tau sobre la homeostasis de calcio intracelular. Como los datos anteriores se obtuvieron con SH-SY5Y de más de 10 pases ( $>10$ ), repetimos el mismo experimento con SH-SY5Y con menor número de pases ( $<10$ ). En estas condiciones, comprobamos que la señal de calcio intracelular provocada por tau es menos duradera que en el caso de las células de más pases (figura 11). En las células de menos pases, el aumento en los niveles de calcio intracelular es similar al observado en presencia de acetilcolina. Este incremento de calcio inducido por tau no aparece cuando las células se incuban previamente con atropina (figura 11) sugiriendo, de nuevo, que el aumento intracelular de calcio provocado por tau está mediado por los receptores muscarínicos. Por tanto, la diferencia en los niveles de calcio en presencia de tau según la cantidad de pases puede deberse a la expresión diferencial de los distintos subtipos de receptores muscarínicos.



**Figura 11.** El efecto de tau sobre el incremento intracelular de calcio varía según la cantidad de pases de las SH-SY5Y. (A) Cambios en la fluorescencia de Fura-2 con el tiempo en SH-SY5Y con bajo número de pases (<10) estimuladas con 1  $\mu$ M de tau en ausencia o presencia de 100  $\mu$ M de atropina. En (B) se presentan los datos de experimentos similares a los de (A) pero, en este caso, las células tienen un mayor número de pases (>10). Como en las figuras anteriores, las líneas de la parte superior de la gráfica representan los periodos de estimulación y los datos son la media de la respuesta de  $\geq 20$  células. Las barras de error indican la desviación estándar.

### 1.3. Patrón de expresión de los receptores muscarínicos en las SH-SY5Y

Para determinar qué subtipos de receptores muscarínicos podrían ser responsables del efecto de tau sobre la movilización intracelular de calcio, en un primer momento, quisimos caracterizar los receptores muscarínicos que se expresan en las SH-SY5Y. Mediante el uso de la técnica de PCR cuantitativa con el reactivo *SYBR Green*, determinamos los niveles de expresión de los distintos subtipos de receptores muscarínicos presentes en las células SH-SY5Y con pocos y muchos pases. La figura 12 refleja que las SH-SY5Y de pocos pases (<10) expresan los cinco subtipos de receptores muscarínicos siendo el M1, el M3 y el M2 los más abundantes en ese orden, seguidos por el M4 y, por último, el M5. Con los pases (>10), observamos que los niveles de expresión de los distintos receptores varían ligeramente: la expresión de M2 disminuye y, por el contrario, la de M3 y M4 aumenta. Estos resultados confirman que las diferencias observadas en el efecto de tau sobre el calcio intracelular dependiendo del número de pases de las SH-SY5Y radican en la variación del tipo y la cantidad de los receptores muscarínicos presentes en las células.



**Figura 12.** Niveles de expresión de los receptores muscarínicos (M1-5) en las células SH-SY5Y según el número de pases (más o menos de 10). Los datos para cada subtipo se obtienen usando la técnica de PCR cuantitativa con *SYBR Green*. Los resultados están normalizados con la cantidad de  $\beta$ -actina humana obtenida en cada caso.

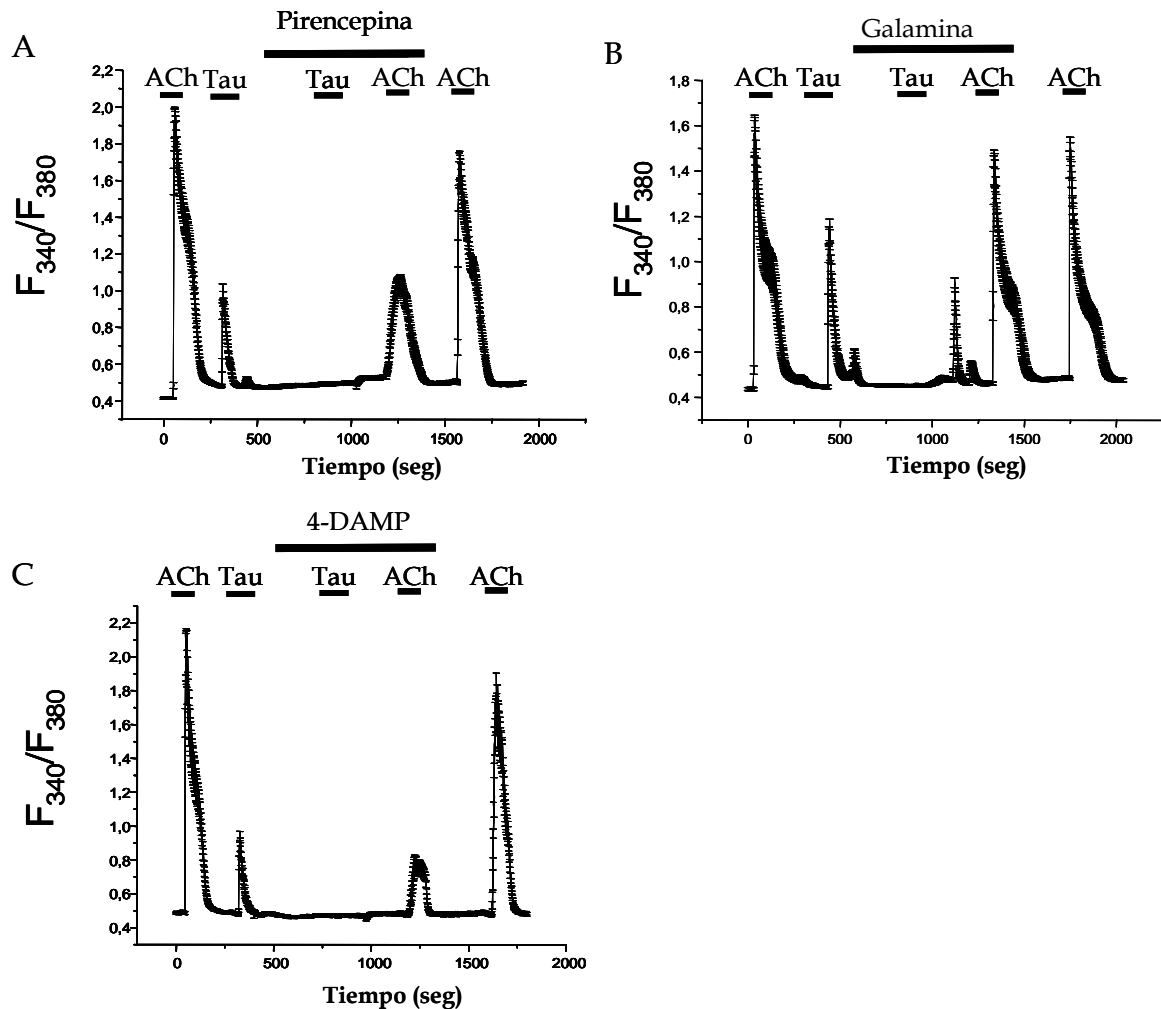
#### **1.4. Análisis farmacológico para determinar los receptores muscarínicos implicados en el efecto de tau sobre los niveles de calcio intracelular en SH-SY5Y**

En vista de que la movilización de calcio por tau parecía mediada por los receptores muscarínicos, quisimos determinar cuáles eran los subtipos implicados mediante un estudio farmacológico. En estos experimentos, usamos distintos antagonistas específicos de los receptores muscarínicos: la pirencepina para bloquear el receptor M1 (Rosati et al., 1999), la galamina para bloquear el M2 (Gnagey et al., 1999) y el 4-DAMP para bloquear el M3 (Fritz et al., 2005). Los resultados obtenidos en estos estudios mostraron que, tanto la pirencepina (10  $\mu$ M) como el 4-DAMP (2  $\mu$ M), previenen la movilización intracelular de calcio en presencia de tau (figura 13 A y C). Por el contrario, las incubaciones con galamina (2  $\mu$ M) no parecen afectar al efecto de tau sobre la desregulación de calcio (figura 13 B). Estos datos sugieren que los receptores M1 y M3 median el efecto de tau sobre los niveles intracelulares de calcio.

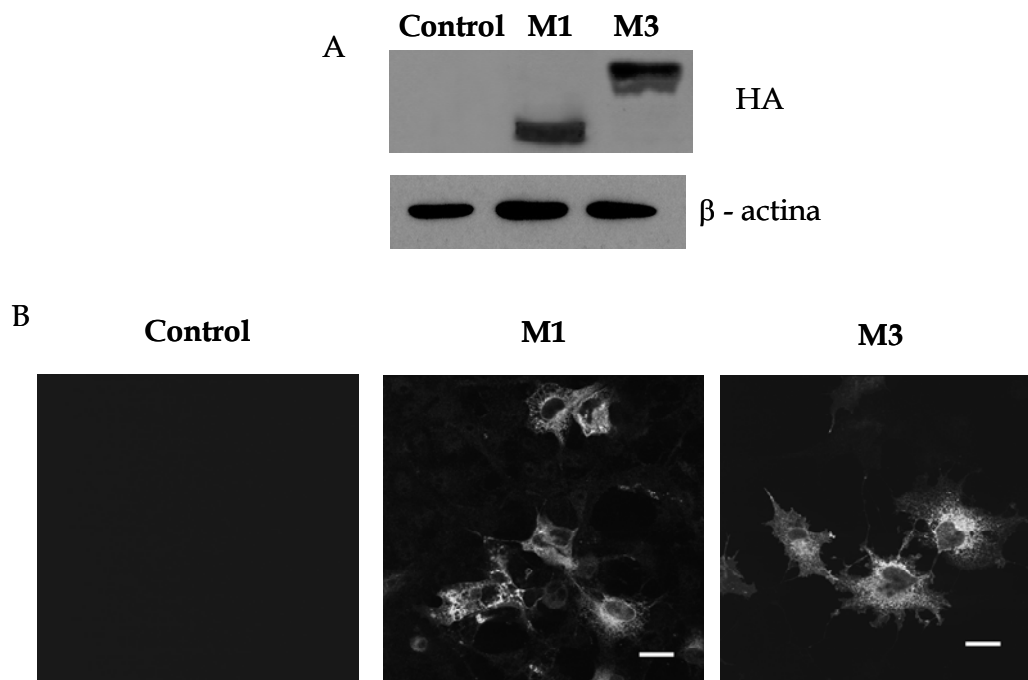
#### **1.5. Transfección transitoria con M1 y M3 en células COS-7 para confirmar la implicación de estos receptores en la movilización de calcio inducida por tau**

Para confirmar las conclusiones de los estudios farmacológicos anteriores, realizamos un nuevo abordaje experimental en células COS-7 transfectadas de forma transitoria con los receptores muscarínicos M1 y M3.

Primero, quisimos comprobar si las células COS-7 eran un buen modelo celular para estudiar el efecto de tau sobre los niveles de calcio. Usando la PCR cuantitativa con el reactivo *SYBR Green*, comprobamos, que esta línea celular, en comparación con las SH-SY5Y, no expresa los distintos subtipos de receptores muscarínicos (datos no mostrados). El siguiente paso fue comprobar si las células COS-7 transfectadas de forma transitoria con M1 y M3 expresaban los transgenes. Realizamos la transfección transitoria con plásmidos que contienen el cDNA de los receptores muscarínicos humanos M1 o M3 unidos a un *tag* (3 x hemaglutinina o HA) en el extremo amino-terminal. Como se muestra en la figura 14, usando el anticuerpo que reconoce el HA, en *western blot* e inmunofluorescencia, comprobamos la expresión de M1 y M3 en las COS-7 transfectadas de forma transitoria con M1 y M3, respectivamente. Además, observamos, mediante las dos técnicas, que las COS-7 control transfectadas con el vector vacío (pcDNA 3.1) no presentan inmunorreactividad frente al anticuerpo HA.

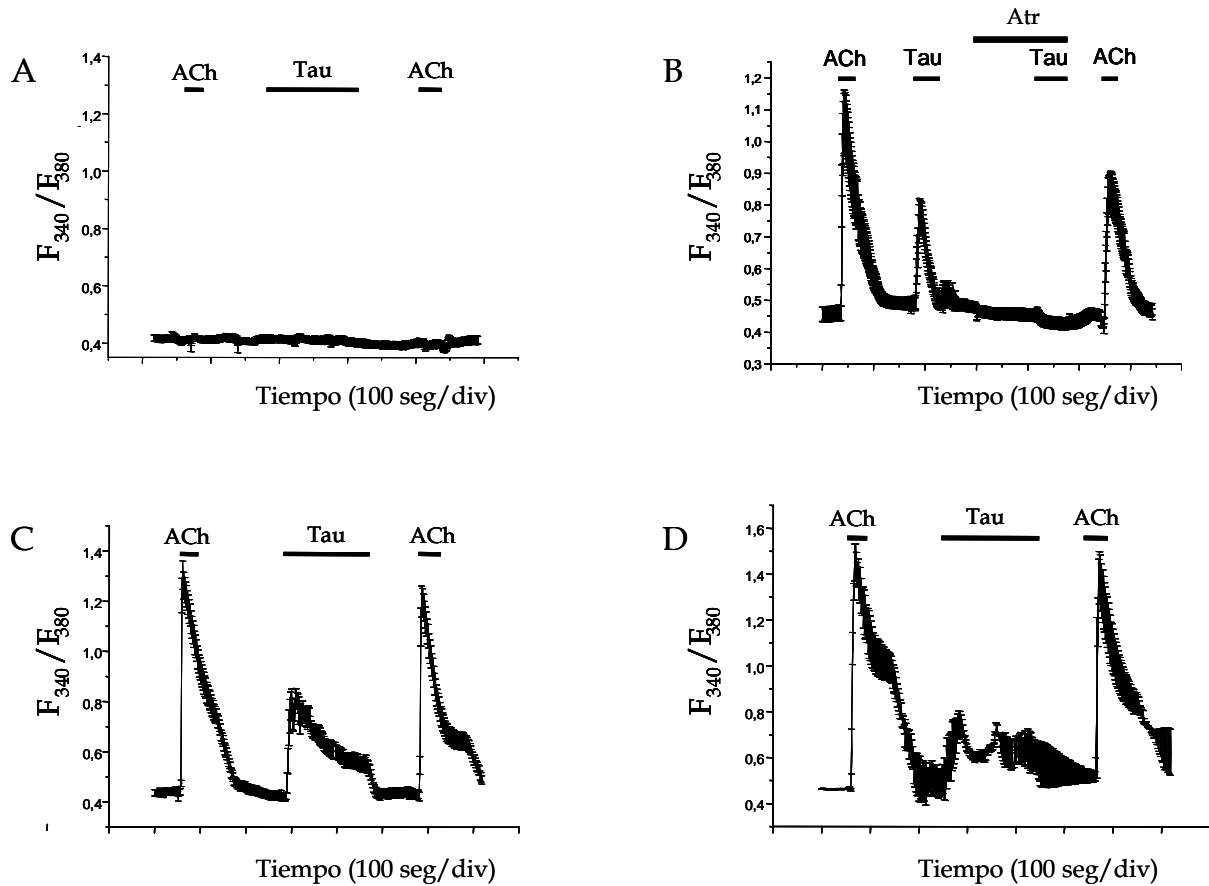


**Figura 13.** Identificación farmacológica de los receptores muscarínicos implicados en el efecto de tau sobre los niveles de calcio intracelular. Los datos mostrados representan los cambios en la fluorescencia de Fura-2 con el tiempo. En todos los experimentos, las SH-SY5Y, cargadas con Fura-2, se estimularon primero, con acetilcolina (50  $\mu$ M) y tau (1  $\mu$ M) y seguidamente, con tau (1  $\mu$ M) y acetilcolina (50  $\mu$ M) en presencia de distintos antagonistas para los receptores muscarínicos: pirenzepina (antagonista de M1; 10  $\mu$ M; A), galamina (de M2; 2  $\mu$ M; B) y 4-DAMP (de M3; 2  $\mu$ M; C). Finalmente, tras varios lavados, se añadió acetilcolina (50  $\mu$ M) para confirmar la viabilidad de las células. Las líneas de la parte superior de la gráfica representan los periodos de estimulación y las barras de error, la desviación estándar. Los resultados presentados son la media de la respuesta de  $\geq 20$  células.



**Figura 14.** Transfección transitoria de las células COS-7 con plásmidos que contienen el cDNA de los receptores muscarínicos humanos M1 o M3 unidos a un *tag* (3 x HA) en el extremo amino-terminal. Las células control se transfectaron con el vector vacío (pcDNA 3.1) en las mismas condiciones. (A) *Western blot* de los extractos proteicos de las COS-7 transfectadas usando el anticuerpo frente a HA, que reconoce el *tag* del transgén, y la  $\beta$ -actina. (B) Imágenes de microscopía confocal de la inmunofluorescencia con el anti-HA en cubreobjetos con COS-7 transfectadas con M1 o M3. Con ambas técnicas, se confirma la expresión de los plásmidos transfectados. Barra de calibración = 50  $\mu$ m.

Más tarde, ensayamos las COS-7 transfectadas con el vector vacío (pcDNA 3.1) y vimos que éstas no responden ante acetilcolina o tau (figura 15 A). Sin embargo, las células que expresan M1 o M3 sufren un aumento en los niveles de calcio intracelular al añadir tau (figura 15 B-C). Observamos resultados similares en el caso de las COS-7 transfectadas de forma transitoria con ambos receptores M1 y M3 (figura 15 D).



**Figura 15.** La proteína tau induce un incremento en el calcio intracelular en las células COS-7 que expresan M1 y M3. Los datos representan los cambios en la fluorescencia de Fura-2 con el tiempo en COS-7 transfectadas con el vector vacío (A), M1 (B), M3 (C), M1 y M3 (D). En todos los experimentos, las COS-7, cargadas con Fura-2 AM, se estimulan primero, con acetilcolina (50  $\mu$ M) y después con tau (1  $\mu$ M) y por último, con acetilcolina (50  $\mu$ M) para confirmar la viabilidad de las células. En (A), las células control no responden ni a acetilcolina ni a tau. (B) Las células COS-7 que expresan M1 responden a acetilcolina y a tau. El efecto de tau observado en las COS-7 transfectadas con M1 es similar al de las SH-SY5Y. No se aprecia este efecto en presencia de 100  $\mu$ M de atropina (Atr). El efecto de la acetilcolina y la proteína tau sobre la movilización intracelular de calcio es similar en (C) y (D). Las líneas de la parte superior de la gráfica representan los periodos de estimulación y los datos presentados son la media de la respuesta de  $\geq 20$  células  $\pm$  la desviación estándar.



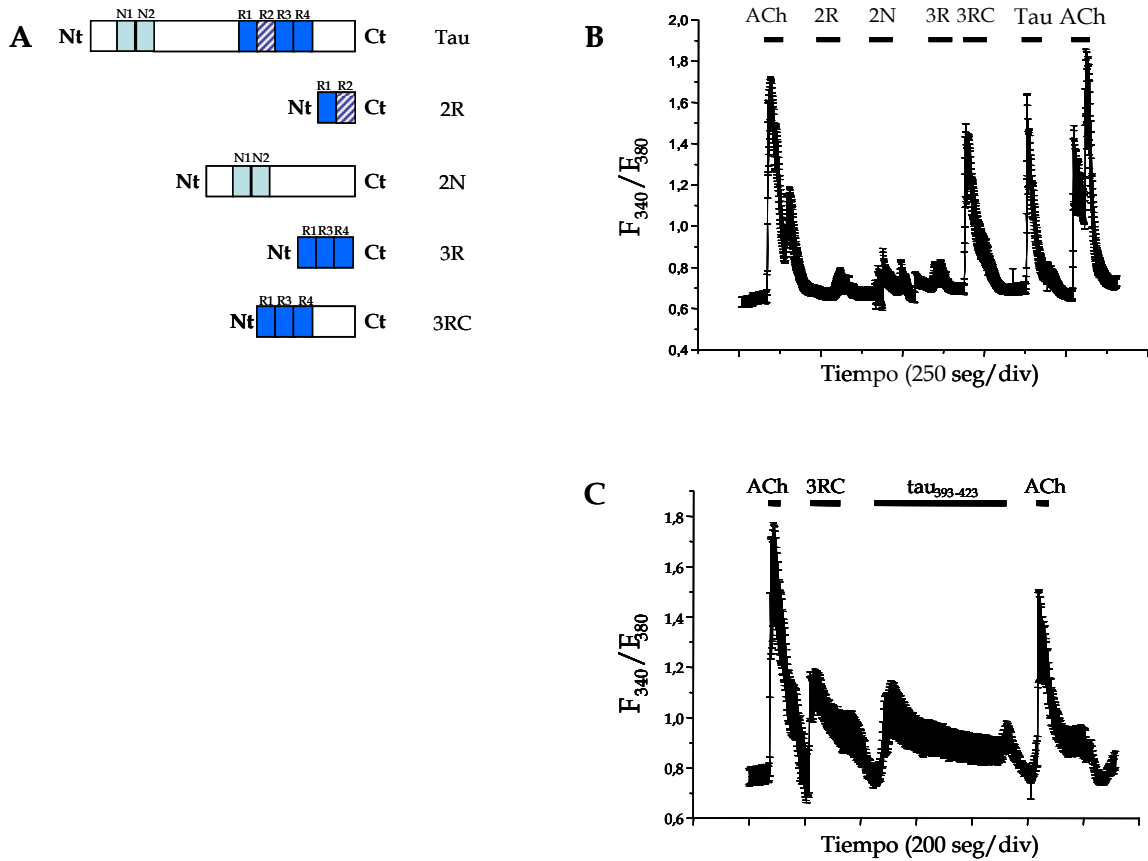
### **1.6. Identificación de la región de tau capaz de alterar la homeostasis intracelular de calcio en células COS-7 que expresan M3**

Para determinar qué región de la proteína tau está implicada en el aumento de la concentración de calcio, incubamos las células COS-7 transfectadas transitoriamente con M3 en presencia de tau y distintos fragmentos de tau (figura 16 A).

En este experimento, empleamos de nuevo la mayor isoforma de tau (compuesto por un extremo amino-terminal, dos insertos amino-terminales (N), cuatro repeticiones de unión a microtúbulos (R) y una zona carboxilo-terminal (C)) y los fragmentos de tau siguientes: 2R (contiene la primera y tercera repetición), 2N (compuesto por la mitad amino-terminal de tau incluyendo los dos insertos), 3R (con la primera, tercera y cuarta repetición) y 3RC (con la primera, tercera y cuarta repetición y el extremo carboxilo-terminal de tau) (Perez et al., 1996).

De este modo, observamos que el fragmento de tau 3RC es el que induce una mayor respuesta en la movilización de calcio intracelular de las células que expresan M3 (figura 16 B). Estos datos sugieren que la zona carboxilo-terminal es responsable del efecto de tau sobre la movilización de calcio.

Para acotar la zona de la proteína tau implicada en tal efecto, utilizamos un péptido de tau que comprende la secuencia de residuos de 391 a 407 situados en la región carboxilo-terminal. En este caso, comprobamos que las células responden a este péptido incrementando la concentración de calcio en su interior (figura 16 C), confirmando, así, que esta zona de la proteína tau es suficiente para inducir el efecto de tau observado sobre los niveles de calcio.



**Figura 16.** Efecto de los péptidos de tau sobre las COS-7 transfectadas de forma transitoria con M3. (A) Esquema estructural de la isoforma más larga de tau expresada en el SNC (tau) que contiene dos insertos en la región amino-terminal (N) y cuatro repeticiones de unión a microtúbulos (R) (Goedert & Jakes, 1990). También se representan los fragmentos de tau utilizados en este ensayo: tau 2R (contiene la primera y tercera repetición), 2N (compuesto por la mitad amino-terminal de tau incluyendo los dos insertos amino), 3R (con la primera, tercera y cuarta repetición) y 3RC (con la primera, tercera y cuarta repetición y el extremo carboxilo-terminal de tau). En (B y C), aparecen los datos de la fluorescencia de Fura-2 con el tiempo obtenidos en las COS-7 transfectadas con M3. (B) Estas células se estimularon secuencialmente con: 50  $\mu$ M de acetilcolina, 1  $\mu$ M de los diferentes péptidos de tau en el orden siguiente (2R, 2N, 3R y 3RC) y finalmente, 1  $\mu$ M de tau. Por último, se añadió 50  $\mu$ M de acetilcolina para confirmar la viabilidad de las COS-7 ensayadas. En (C), añadimos, en este orden, 50  $\mu$ M de acetilcolina, 1  $\mu$ M de 3RC, 1  $\mu$ M de tau<sub>391-407</sub> (péptido de tau localizado en el extremo carboxilo-terminal que contiene los residuos 391-407) y nuevamente, 50  $\mu$ M de acetilcolina al medio de cultivo de las COS-7 transfectadas con M3. En ambos casos (B y C), las líneas de la parte superior de la gráfica representan los periodos de estimulación y los datos presentados son la media de la respuesta ( $n \geq 20$  células  $\pm$  desviación típica).

### **1.7. El calcio intracelular de las neuronas murinas de hipocampo en cultivo aumenta en presencia de la proteína tau**

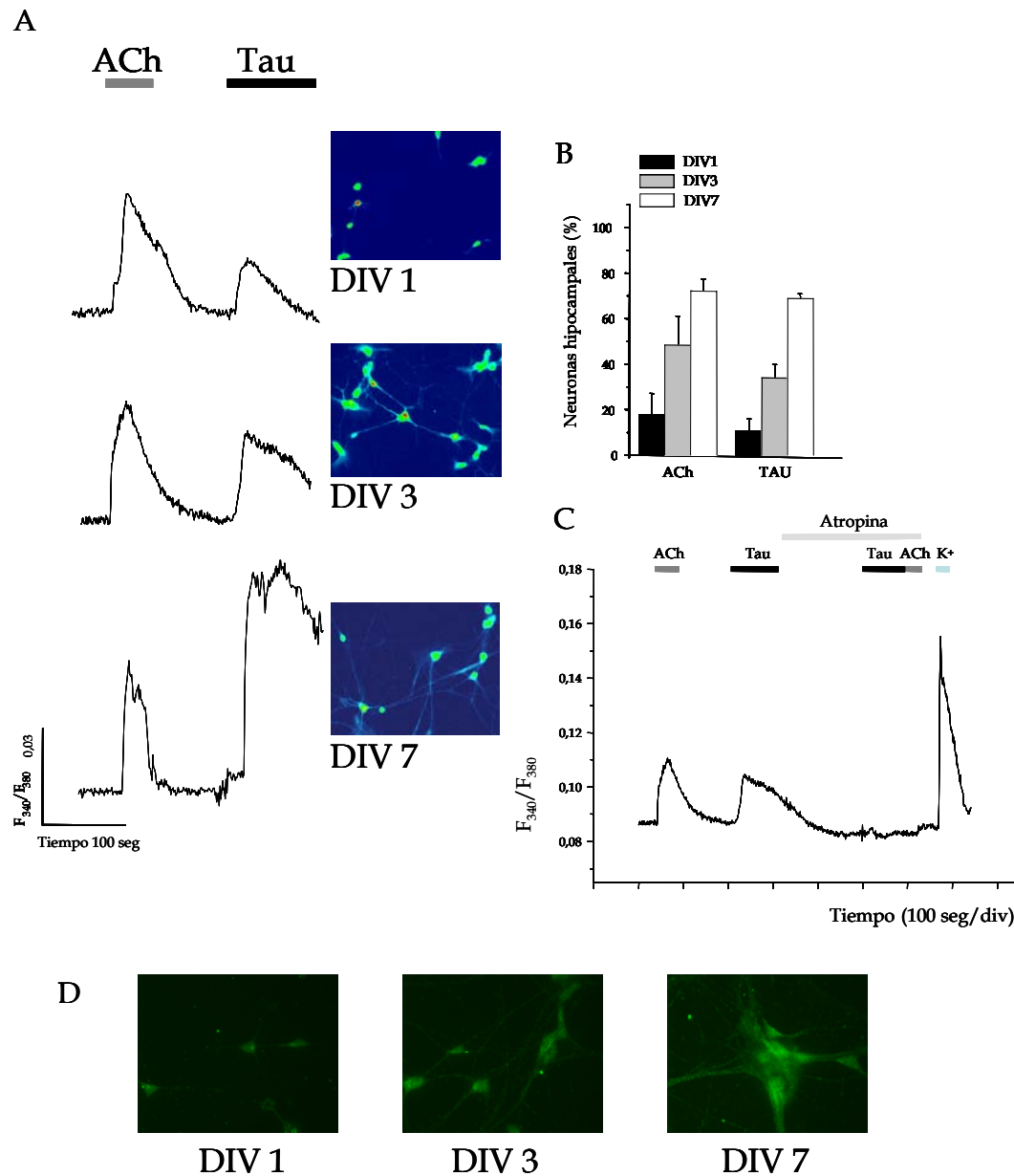
Con el fin de corroborar nuestros resultados en un modelo celular más cercano al entorno fisiológico del cerebro, estudiamos el efecto de tau y de la acetilcolina sobre la concentración de calcio en cultivos de neuronas de hipocampo de 1, 2 o 7 días in vitro (DIV).

En los cultivos de 1 DIV, menos de un 20% de las células responden a la acetilcolina (50  $\mu$ M) o a tau (1  $\mu$ M). Sin embargo, tras 3 DIV, y, sobre todo tras 7 DIV, la proporción de células sensibles a la acetilcolina y a tau aumenta (figura 17 A-B).

También observamos que la proporción de neuronas que expresan M1, detectadas por inmunofluorescencia, aumenta con el número de DIV (figura 17 D).

La respuesta de tau se prolonga más en el tiempo que la de acetilcolina, y, quizá ahí radique su mayor toxicidad para la célula. Como en los experimentos anteriores realizados con las células SH-SY5Y y COS-7, el efecto característico de tau sobre el calcio intracelular desaparece cuando incubamos previamente las células con 100  $\mu$ M de atropina (figura 17 C).

Por último, comprobamos que las neuronas eran funcionales puesto que respondían a 60  $\mu$ M de KCl, un agente despolarizante, añadido al cultivo. Resultados similares se observaron en cultivos de neuronas corticales murinas (datos no mostrados).



**Figura 17.** La proteína tau altera la homeostasis de calcio de neuronas de hipocampo en cultivos primarios. (A) Datos de la fluorescencia de Fura-2 en células hipocámpales de 1, 3 y 7 DIV tras la estimulación secuencial con acetilcolina (50  $\mu$ M) y tau (1  $\mu$ M). Las imágenes representan la respuesta de las neuronas frente a tau. En (B), se muestra el porcentaje de neuronas de hipocampo que responden a acetilcolina (50  $\mu$ M) o a tau (1  $\mu$ M) tras 1, 3 o 7 DIV. (C) Cambios en la fluorescencia de Fura-2 en las neuronas de 3 DIV estimuladas con acetilcolina (50  $\mu$ M) y tau (1  $\mu$ M) en presencia o ausencia de 100  $\mu$ M de Atropina. Por último, las neuronas se despolarizaron con KCl (60  $\mu$ M) para confirmar su viabilidad. Los periodos de estimulación se representan como líneas en la parte superior de la gráfica. Los datos presentados son la media de la respuesta de  $\geq 20$  células. (D) Inmunofluorescencia con el anticuerpo que reconoce el receptor M1 en las neuronas de hipocampo fijadas a 1, 3 o 7 DIV.

## **2. EFECTO DE DISTINTOS AGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE SOMATOSTATINA (sst) SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE TAU EN LA Ser262**

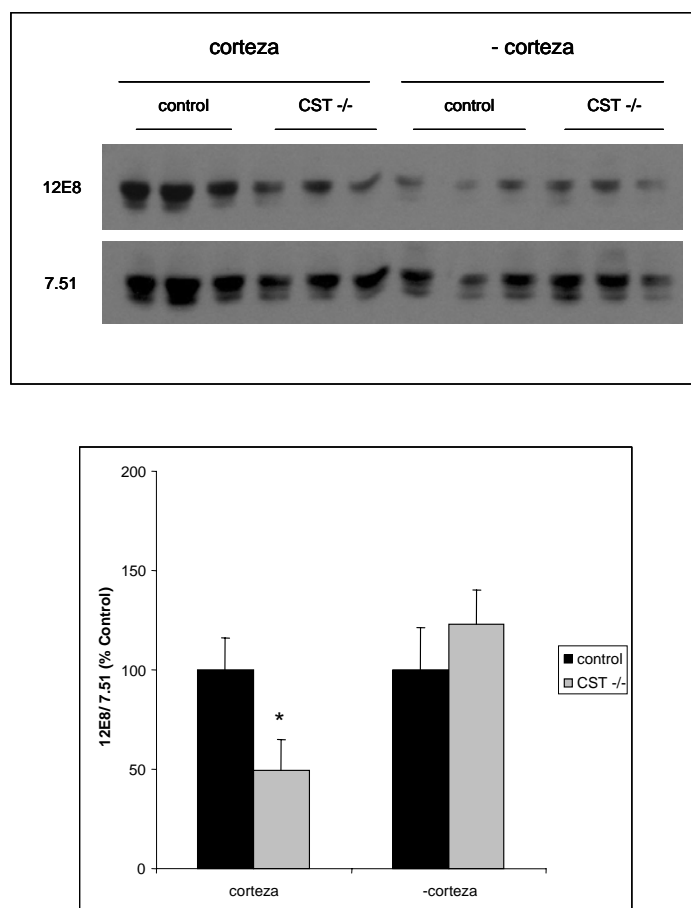
### **2.1. El nivel de fosforilación de la Ser262 de tau es menor en la corteza de los ratones que no expresan cortistatina**

La aparición de la patología de tau en la corteza cerebral de los pacientes con EA representa un momento crítico en el desarrollo de la demencia (Delacourte et al., 1999). La fosforilación de tau localizada en la corteza cerebral puede deberse a la presencia de un neuropéptido cortical conocido como cortistatina. Para estudiar esta posibilidad, comparamos los niveles de fosforilación de tau en los ratones modificados genéticamente que no expresan cortistatina (CST -/-) y en los ratones control. Como vimos, aunque los sitios de fosforilación de tau se localizan, en su mayoría, en la región rica en prolinas y carboxilo-terminal, la fosforilación de los sitios situados en la región de unión a los microtúbulos afecta en mayor grado a la unión de tau a los microtúbulos (Cho & Johnson, 2003; Drewes et al., 1995; Sengupta et al., 1998; Singh et al., 1996). De entre estos sitios, por el momento, sólo se ha demostrado la relevancia biológica de la fosforilación de la Ser262, por tanto, nuestro estudio se ha centrado en este residuo de tau (Biernat et al., 1993; Drewes et al., 1997; Morishima-Kawashima et al., 1995; Perez et al., 2005). Si se observa la figura 18 puede comprobarse que los niveles de fosforilación de tau en la Ser262 en los extractos de corteza de los ratones control son unas dos veces mayores a los obtenidos de la corteza de los ratones CST -/- de misma edad ( $p < 0.05$ ). Del mismo modo, analizamos la fosforilación de tau en la Ser262, epítipo reconocido por el anticuerpo 12E8, en los extractos obtenidos a partir del resto de tejido cerebral (sin corteza ni hipocampo) de los animales anteriores. En este caso, sin embargo, no detectamos diferencias significativas entre los ratones control y los CST -/- (figura 18). Tampoco encontramos diferencias significativas al analizar la fosforilación de tau en el hipocampo (datos no mostrados). Estos datos sugieren que la cortistatina parece modular la fosforilación de tau en la Ser262 específicamente en la corteza siendo estas neuronas dianas para la cortistatina. También analizamos mediante *western blot* estos mismos extractos proteicos usando, esta vez, el anticuerpo PHF1 que reconoce las Ser396 y Ser404 fosforiladas de tau. En este caso, no encontramos diferencias significativas (datos no mostrados).

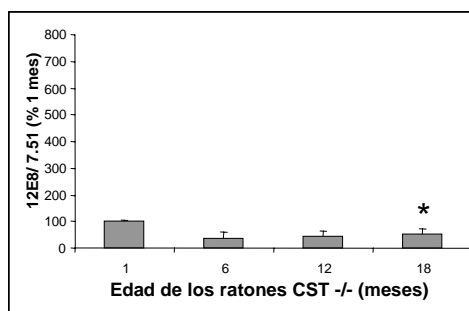
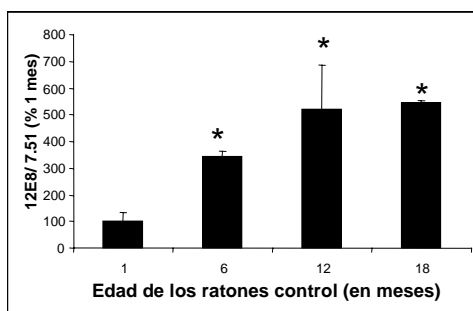
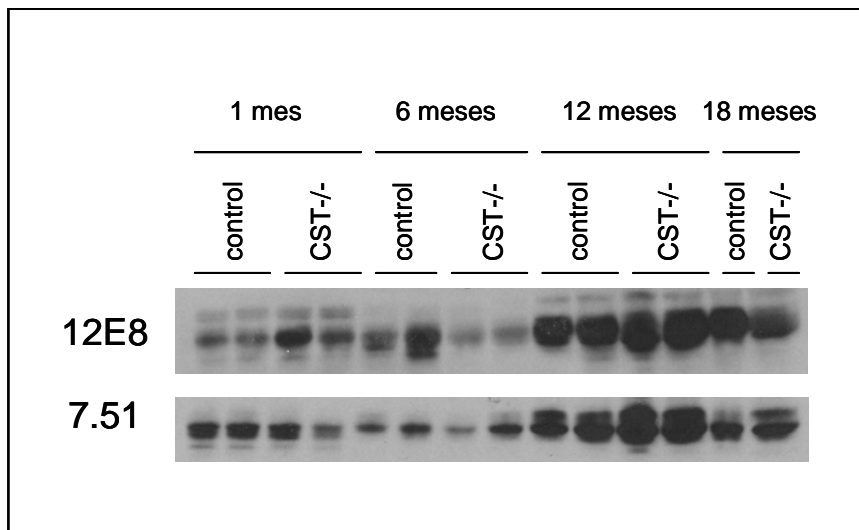
Teniendo en cuenta que la edad representa el mayor factor de riesgo de la EA (Jicha et al., 2008; Jorm & Jolley, 1998; Kawas & Corrada, 2006; Kukull & Bowen, 2002), quisimos comprobar si los niveles de fosforilación de tau en la Ser262 varían con la edad en los ratones. Para ello, estudiamos los niveles de fosforilación de tau en la Ser262 utilizando el anticuerpo 12E8 en las

corteza de animales control y CST  $-/-$  de distintas edades (1, 6, 12 y 18 meses). Observamos que la fosforilación de tau en la Ser262 aumenta con la edad en las corteza de los ratones control (figura 19). En cambio, este aumento no se aprecia cuando se analiza la fosforilación de la Ser262 de tau en los extractos de corteza de los ratones que no expresan cortistatina.

Posteriormente, realizamos el test de comportamiento del reconocimiento de objeto a los ratones control y CST  $-/-$  de más de un año de edad. Este sencillo test permite estudiar si existe deterioro de la memoria declarativa (Winters et al., 2008). El reconocimiento de nuevos objetos es una tarea difícil para muchos pacientes con enfermedades neurodegenerativas (Hajilou & Done, 2007; Holdstock, 2005; Laatu et al., 2003; Lee et al., 2003; Purdy et al., 2002). En nuestro trabajo, comprobamos que los ratones control y CST  $-/-$  de más de un año de edad no presentan diferencias significativas en el test de reconocimiento de objeto ( $n = 9$  control,  $n = 11$  CST  $-/-$ ; datos no mostrados).



**Figura 18.** La fosforilación de tau en la Ser262 es menor en la corteza de ratones CST  $-/-$ . Se realizaron extractos proteicos a partir de la corteza y del resto de tejido cerebral, sin corteza ni hipocampo (-corteza), de ratones control y CST  $-/-$  de 3 meses de edad. Los datos presentados se corresponden con los *western blots* (panel superior) y la cuantificación por densitometría (panel inferior) de la fosforilación de tau en la Ser262 (usando el anticuerpo 12E8) normalizada con los niveles de proteína tau total (anticuerpo 7.51). Los datos mostrados son las medias en unidades arbitrarias  $\pm$  la desviación típica ( $n = 3$ ). \* $p < 0.05$  comparados con los datos control.



**Figura 19.** La fosforilación de tau en la Ser262 aumenta con la edad en las cortezas de los ratones control pero no en las de los ratones CST  $-/-$ . Se obtuvieron extractos proteicos de la corteza cerebral de ratones control y CST  $-/-$  de distintas edades (1, 6, 12 y 18 meses). Posteriormente, se analizaron por *western blot* (panel superior) utilizando los anticuerpos que detectan la Ser262 fosforilada de tau (12E8) y el tau total (7.51). Las gráficas representan la cuantificación por densitometría en unidades arbitrarias de la fosforilación de tau en la Ser262. Se normalizaron los niveles de fosforilación de tau en la Ser262 con la cantidad de tau total. El panel de la derecha muestra los resultados obtenidos con los extractos de los ratones control y, el de la izquierda, los de los ratones CST  $-/-$ . Los datos representan las medias  $\pm$  la desviación típica ( $n = 2-4$ ). \* $p < 0.05$  comparados con los ratones de 1 mes de edad.

## 2.2. La cortistatina promueve la fosforilación de tau en la Ser262 de cultivos primarios de neuronas corticales murinas

Para corroborar *in vitro* los resultados mencionados anteriormente obtenidos a partir de experimentos *in vivo*, añadimos a cultivos primarios de neuronas corticales murinas 50 nM de cortistatina durante distintos tiempos de incubación (5, 15 y 30 min). Más tarde, analizamos mediante la técnica de *western blot* los niveles de fosforilación de tau en los distintos extractos proteicos usando los anticuerpos frente a tau siguientes: el 12E8 que detecta la fosfoSer262 y el PHF1 que reconoce ambas Ser396 y Ser404 fosforiladas. Observamos que las incubaciones de 30 minutos con cortistatina aumentan de forma significativa, unas dos veces respecto al control, los niveles de fosforilación de la proteína tau en la Ser262 ( $p < 0.01$ ; figura 20 A).

En vista de que los niveles de fosforilación de los controles eran sorprendentemente elevados, quisimos comprobar si algún factor presente en el medio del cultivo celular podía inducir un aumento en la fosforilación de la Ser262 de tau. Para ello, aumentamos el tiempo de incubación de las células corticales en presencia de medio neurobasal (NB) sin suero pasando de estar 2 horas (como en el experimento anterior) a estar 6 horas. Esta vez observamos que efectivamente los niveles de fosforilación de la proteína tau en la Ser262 reconocidos por el anticuerpo 12E8 disminuyen cuando la incubación en NB es más larga (figura 20 B).

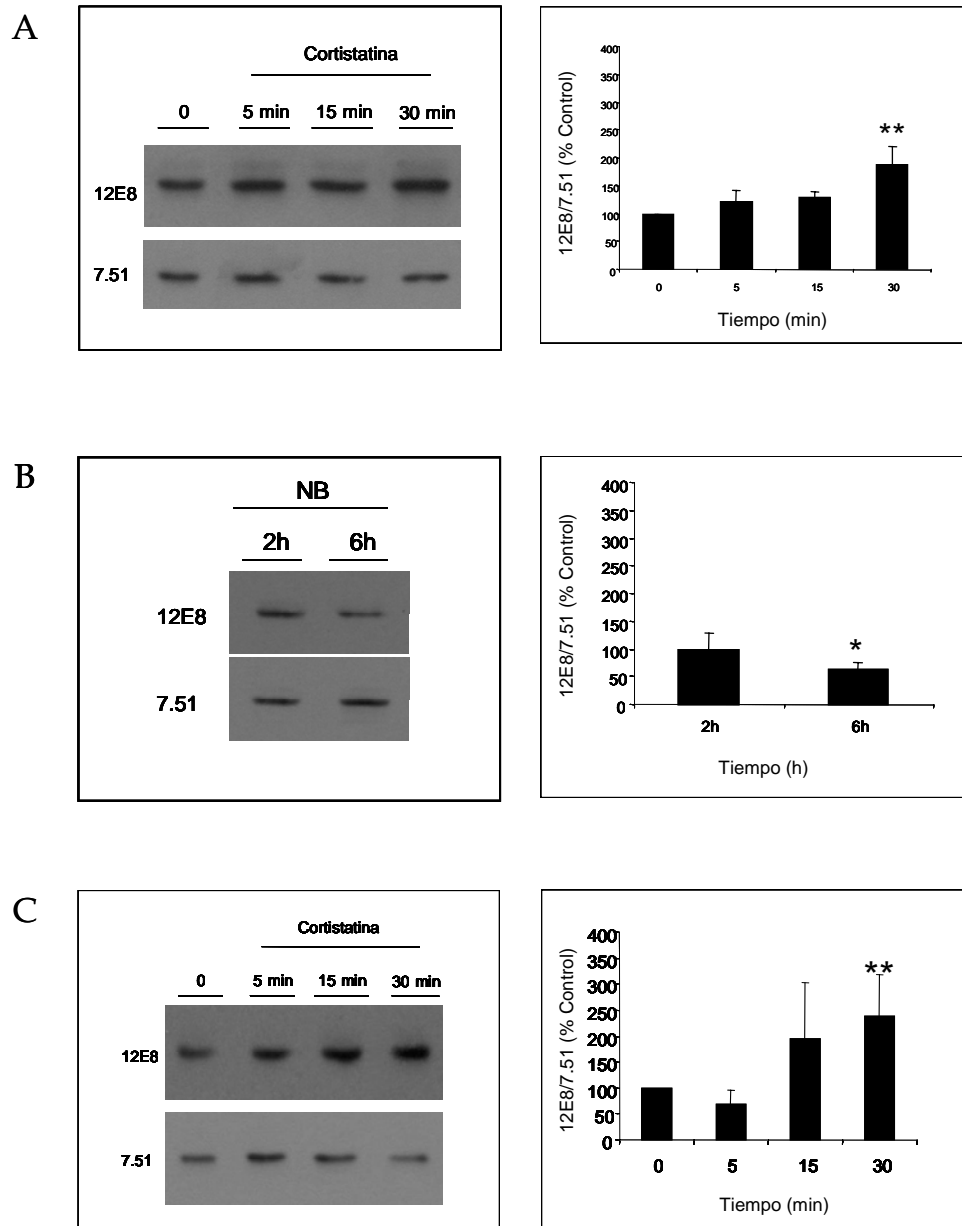
En este caso, repetimos el tratamiento anterior de 50 nM de cortistatina, pero esta vez en células incubadas previamente en NB durante 6 horas y, de este modo, confirmamos nuevamente que la cortistatina induce un aumento significativo en los niveles de fosforilación de la proteína tau en la Ser262 y observamos que este aumento es algo mayor al del experimento anterior en el que las células estuvieron 2 horas en presencia de NB ( $p < 0.05$ ; figura 20 C).

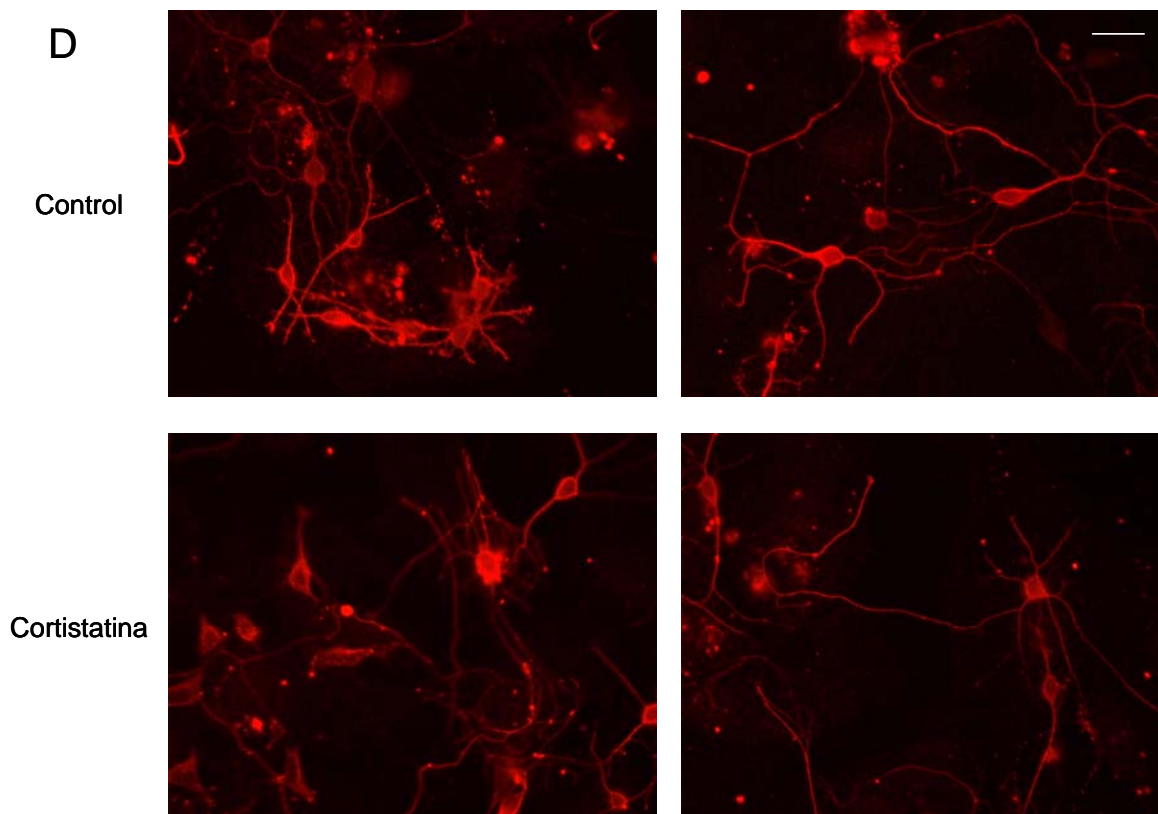
Comparamos las células tratadas con cortistatina con las tratadas con el vehículo mediante el uso de inmunofluorescencia. Usando el anticuerpo 334, que reconoce la isoforma  $\beta_3$  neuronal de la tubulina, comprobamos que el aumento de la fosforilación de tau en la Ser262 inducido por la cortistatina no es suficiente para producir un cambio morfológico aparente en las células (figura 20 D). Tanto en las células tratadas como en las tratadas con el vehículo encontramos neuronas con prolongaciones largas y otras con extensiones de menor longitud. Tampoco observamos diferencias al analizar los cubre-objetos tratados y controles mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo 12E8 que reconoce la Ser262 fosforilada de tau (datos no mostrados).

También analizamos por *western blot* los mismos ensayos de 50 nM de cortistatina usando el anticuerpo PHF1 que reconoce las Ser396/404 fosforiladas. Sin embargo, en este caso, no se encontraron diferencias en los niveles de fosforilación de este epítipo (datos no mostrados).

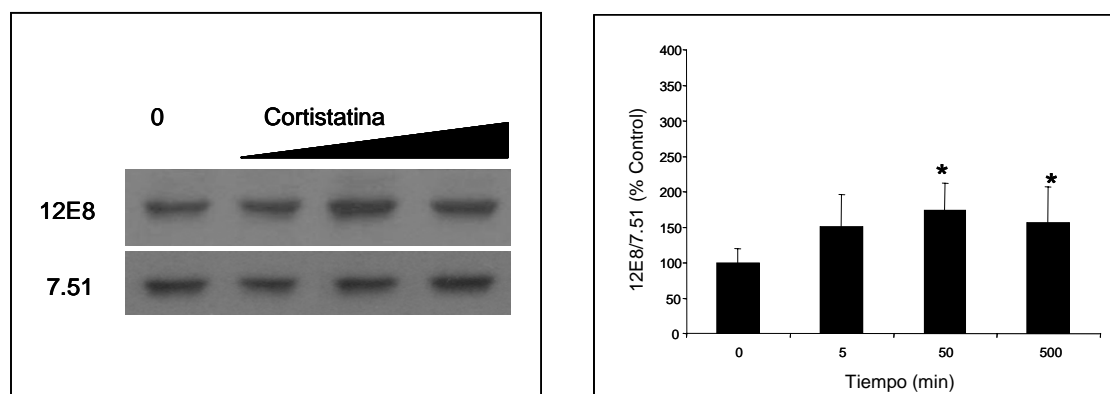


Para estudiar el efecto de distintas concentraciones de cortistatina en la fosforilación de la Ser262 de tau, añadimos al medio de cultivo de las neuronas corticales, tras 2 horas en NB sin suero, 5 nM, 50 nM y 500 nM de cortistatina durante 30 minutos (figura 21). Las diferentes concentraciones de cortistatina producen un aumento de los niveles de fosforilación de tau en la Ser262 alcanzando una meseta a 50 nM ( $p < 0.05$ ).





**Figura 20.** Aumento de la fosforilación de tau en la Ser262 en presencia de cortistatina en cultivos primarios de neuronas corticales murinas. (A) Tras 2 horas en NB sin suero, las neuronas en cultivo se incubaron con 50 nM de cortistatina durante 5, 15 y 30 minutos y, después, se analizaron los extractos proteicos mediante *western blot*. La cuantificación (panel derecho) de la fosforilación de tau en la Ser262 usando el anticuerpo 12E8 se realizó por densitometría en unidades arbitrarias. Los datos de fosforilación de tau se normalizaron con los valores de tau total reconocido por el anticuerpo 7.51. (B) *Western blots* y cuantificación (a la derecha) realizada como se describe anteriormente, de los niveles basales de fosforilación de tau en la Ser262 tras 2 o 6 horas de incubación en NB sin suero. En (C) repetimos el mismo experimento que en (A) pero después de 6 horas de incubación en NB sin suero. En todos los casos, los datos presentados son las medias en unidades arbitrarias  $\pm$  la desviación típica de los experimentos realizados por triplicado. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  respecto al control. (D) Inmunofluorescencia con el anticuerpo 334 (en rojo) en neuronas tratadas, en las mismas condiciones, con el vehículo (control) y tratadas con cortistatina (50 nM, 30 min) tras 2 horas en NB sin suero. A la derecha, aparecen neuronas con extensiones de corta longitud y, a la izquierda, células con prolongaciones mayores. Barra, 50  $\mu$ m.



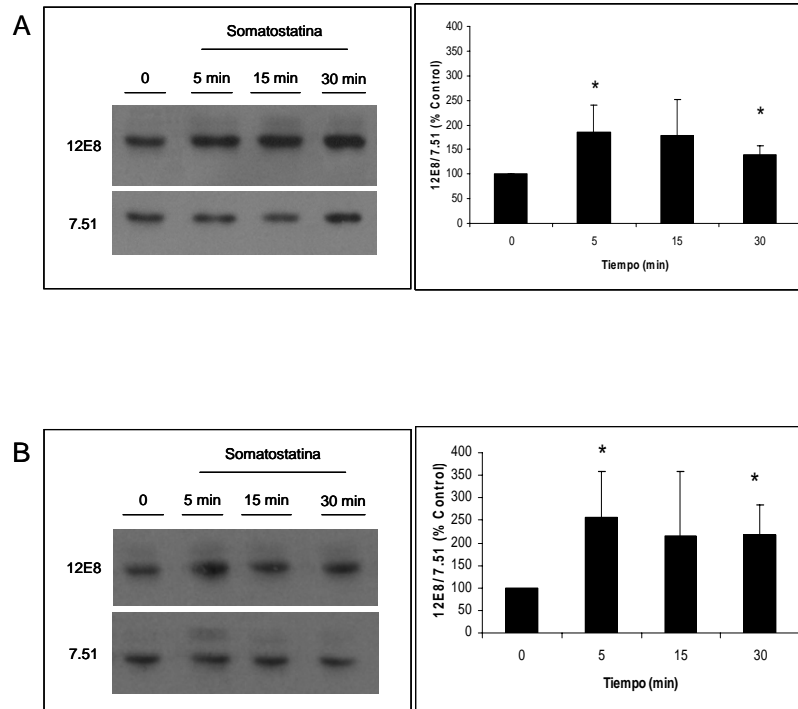
**Figura 21.** Efecto de la concentración de la cortistatina sobre la fosforilación de tau en la Ser262 en neuronas corticales en cultivo. Tras 2 horas en NB sin suero, se trataron las células con diferentes concentraciones de cortistatina (5 nM, 50 nM y 500 nM) durante 30 minutos. Más tarde, se analizaron los extractos proteicos mediante *western blot*. La cuantificación (panel derecho) de la fosforilación de tau en la Ser262 (usando el anticuerpo 12E8) se realizó por densitometría y el resultado está indicado en unidades arbitrarias. Los niveles de fosforilación de tau en la Ser262 se normalizaron con los niveles de proteína tau total detectados por el anticuerpo 7.51. Las distintas concentraciones de cortistatina inducen un aumento significativo en la fosforilación de tau en la Ser262. Los datos representan las medias  $\pm$  la desviación típica de los experimentos realizados por triplicado. \* $p < 0.05$  respecto al control sin cortistatina.

### 2.3. La somatostatina también favorece la fosforilación de tau en la Ser262 pero con una cinética diferente a la de la cortistatina en neuronas corticales murinas en cultivo

Como la cortistatina pertenece a la familia de la somatostatina y para estudiar el efecto de la somatostatina sobre los niveles de fosforilación de la Ser262 de la proteína tau, tratamos los cultivos primarios de neuronas corticales con somatostatina. Primero, incubamos las células con NB sin suero durante 2 horas y después, añadimos somatostatina a una concentración de 50 nM durante 5, 15 y 30 minutos. La figura 22 A muestra cómo la incubación con somatostatina de tan sólo 5 minutos es suficiente para aumentar de forma significativa los niveles basales de fosforilación de tau en la Ser262, epítipo reconocido por el anticuerpo 12E8 ( $p < 0.05$ ). De modo que la somatostatina también induce un aumento en los niveles de fosforilación de la proteína tau en la Ser262 pero dicho aumento es más rápido que en el caso de los tratamientos con cortistatina.

Como en la figura 20 C, se repitió el tratamiento de neuronas corticales murinas con 50 nM de somatostatina durante distintos tiempos de incubación tras estar 6 horas en NB sin suero. Una vez más, se confirmó que la somatostatina induce un aumento significativo en los niveles de fosforilación de la Ser262 en tratamientos de 5 minutos ( $p < 0.05$ ; figura 22 B).

Además, comprobamos los niveles de fosforilación de tau en las Ser396/404 usando el anticuerpo PHF1. En este caso, como en los tratamientos con cortistatina, los tratamientos con somatostatina no parecían afectar a los niveles de fosforilación de la proteína tau en las Ser396/404 (datos no mostrados).



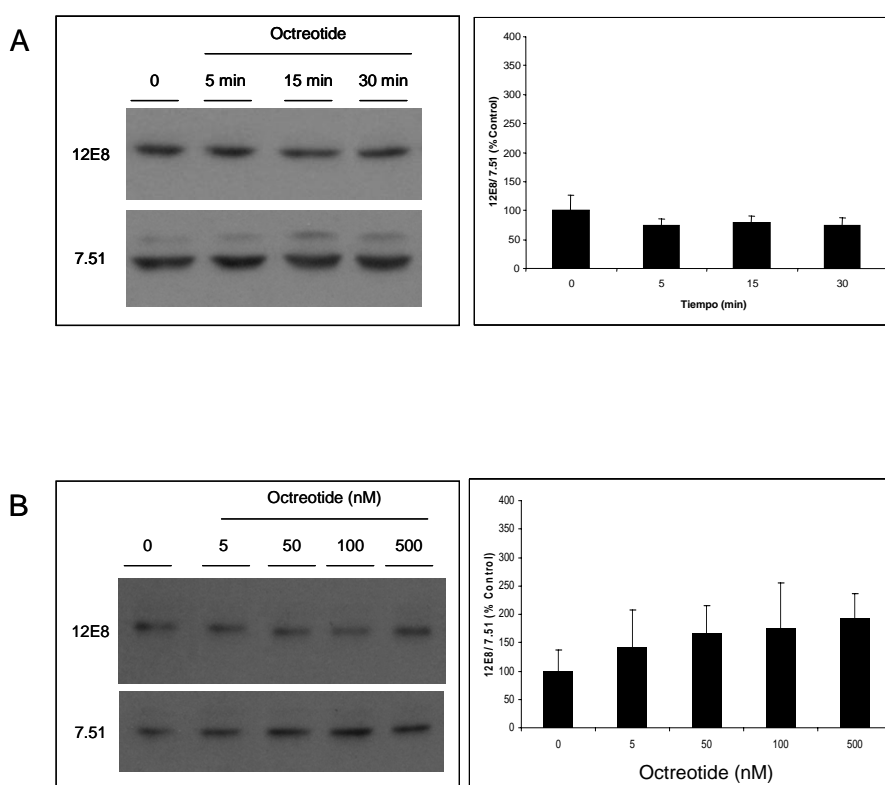
**Figura 22.** La somatostatina induce un aumento en la fosforilación de tau en la Ser262 en cultivos primarios de neuronas corticales murinas. (A) Después de 2 horas en NB sin suero, se incubaron las neuronas en cultivo con 50 nM de somatostatina durante 5, 15 y 30 minutos. Se realizaron *western blots* de los extractos proteicos correspondientes usando los anticuerpos 12E8 (reconoce la Ser262 fosforilada de tau) y 7.51 (tau total). Los datos presentados en unidades arbitrarias representan la cuantificación por densitometría de los *western blots* anteriores. Los niveles de fosforilación de tau en la Ser262 se normalizaron con los de tau total. Aparecen las medias de los datos por triplicado en unidades arbitrarias  $\pm$  la desviación típica. (B) Como en (A) pero la incubación en presencia de medio NB sin suero fue de 6 horas. \* $p < 0.05$  respecto al control sin somatostatina.

#### 2.4. El octreotide no afecta a la fosforilación de tau en la Ser262 de neuronas corticales murinas en cultivo

Para continuar con el estudio de los distintos agonistas de los receptores de somatostatina, nos interesamos por el efecto del octreotide, un octapéptido sintético análogo de la somatostatina que se une preferentemente a sst2, sst3 y sst5, sobre la fosforilación de tau en la Ser262. De forma similar a los ensayos realizados con cortistatina y somatostatina (figuras 20 A y 22 A), incubamos los cultivos primarios de neuronas corticales en NB sin suero durante 2 horas y añadimos distintos tratamientos con 50 nM de octreotide durante 5, 15 y 30 minutos.

Los resultados sugieren que el octreotide no produce un efecto significativo sobre la fosforilación de tau en la Ser262 usando el anticuerpo 12E8 (figura 23 A).

Con objeto de analizar el efecto de distintas concentraciones de octreotide sobre la fosforilación de tau en la Ser262, tratamos los cultivos primarios de neuronas corticales murinas previamente incubadas con NB sin suero (2 h) con 5 nM, 50 nM, 100 nM y 500 nM de octreotide durante 30 minutos. Una vez más, no observamos un efecto significativo del octreotide sobre la fosforilación de tau en la Ser262 en ninguna de las condiciones experimentales anteriores (figura 23 B).



**Figura 23.** El octreotide no afecta a la fosforilación de tau en la Ser262 en neuronas corticales en cultivo. (A) Se incubaron las células en NB sin suero (2h) y se añadió 50 nM de octreotide durante 5, 15 y 30 minutos. Los extractos proteicos se analizaron mediante *western blot* utilizando los anticuerpos frente a tau que reconocen la fosfoSer262 (anticuerpo 12E8) y tau total (anticuerpo 7.51). Los datos obtenidos representan la cuantificación en unidades arbitrarias (panel de la derecha) por densitometría de los niveles de fosforilación de tau en la Ser262 normalizados con los de tau total ( $n = 3 \pm$  la desviación típica). (B) En otro experimento, y tras 2 horas en NB sin suero, se añadió octreotide a las neuronas en distintas concentraciones (5 nM, 50 nM, 100 nM y 500 nM) durante 30 minutos. La cuantificación (a la derecha) de los niveles de inmunorreactividad obtenidos en los *western blots* se realizó como en (A).

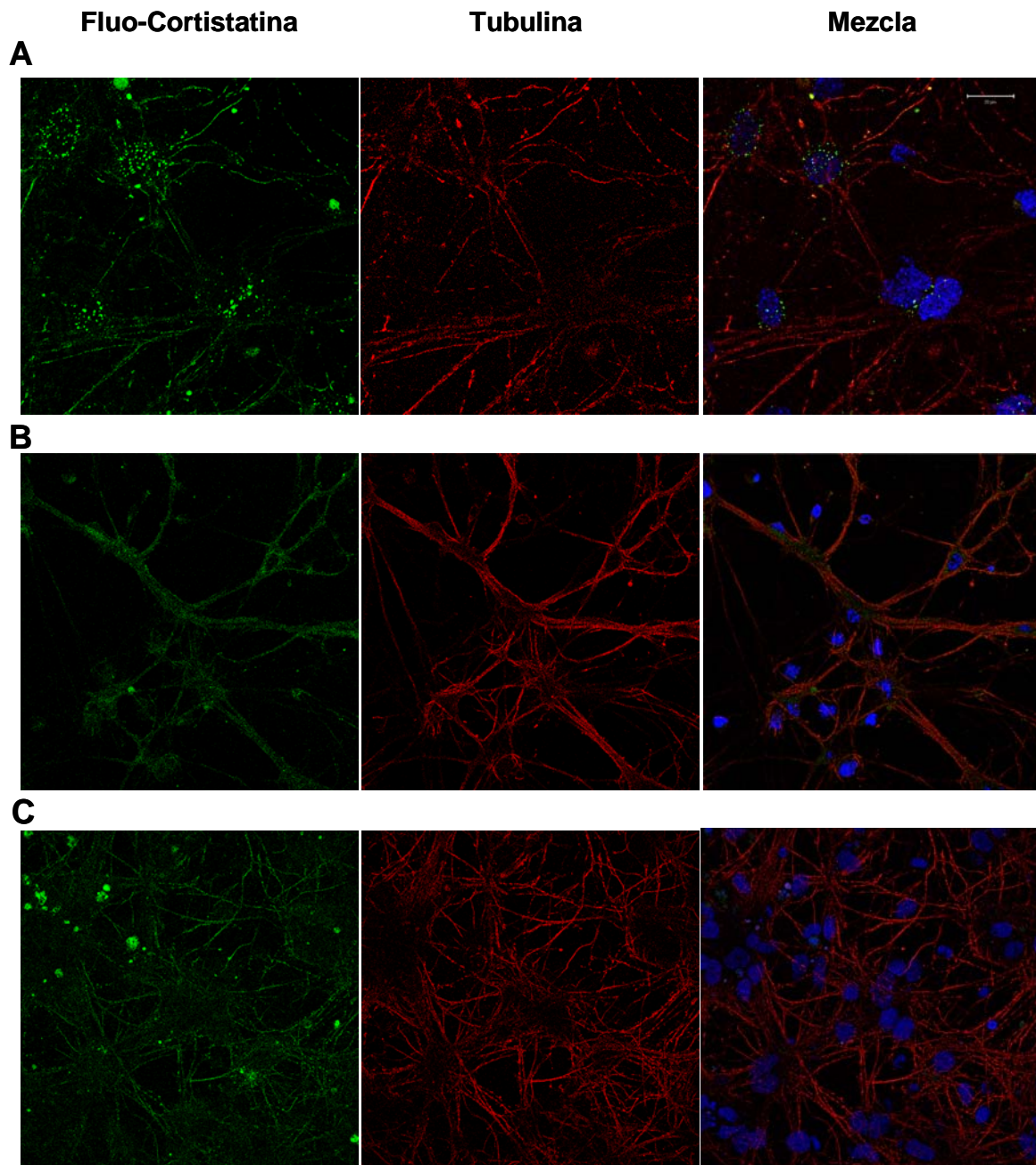
## **2.5. Las neuronas corticales murinas en cultivo presentan receptores que unen cortistatina**

Para comprobar si el efecto de la cortistatina sobre la fosforilación de tau en la Ser262 está mediado por su unión a receptores específicos, estudiamos la unión y la internalización de un compuesto de cortistatina acoplada a fluoresceína (Fluo-cortistatina) en cultivos primarios de neuronas corticales murinas.

En un principio, observamos que algunas de las neuronas incubadas en presencia de Fluo-cortistatina (1-5  $\mu$ M) durante 30 minutos presentaban un intenso marcaje punteado fluorescente en el citoplasma del soma neuronal indicando que se había producido una internalización de los receptores unidos a cortistatina (figura 24 A). Para determinar el número de células que mostraban internalización, realizamos una inmunofluorescencia de los cubre-objetos usando el anticuerpo policlonal 334 que reconoce una isoforma de tubulina neuronal (la  $\beta_3$ ) y DAPI para teñir los núcleos. El  $24 \pm 8\%$  de las células tratadas con Fluo-cortistatina (5  $\mu$ M, 30 min) mostraban internalización (figura 24 A).

Sin embargo, si se observa la figura 24 B, parece que una corta incubación de 1 minuto de duración con Fluo-cortistatina no es suficiente para evidenciar un marcaje fluorescente en el interior neuronal. La unión y la internalización de la Fluo-cortistatina se evita de forma significativa en presencia de un exceso de cortistatina o somatostatina (100  $\mu$ M, 10 min;  $p < 0.05$ ). Estos resultados parecen sugerir que la unión de Fluo-cortistatina está mediada por receptores de somatostatina.

En la figura 24 C, se muestra que la internalización de la Fluo-cortistatina también se ve inhibida cuando se pre-incuban las células con PAO (1  $\mu$ M, 30 min), un potente inhibidor de la endocitosis. Por el contrario, observamos internalización de la Fluo-cortistatina al realizar, como control, el experimento anterior añadiendo a las células el mismo volumen de DMSO, el vehículo donde diluimos el PAO (datos no mostrados). Estos datos sugieren que la internalización de la Fluo-cortistatina en las neuronas corticales murinas en cultivo está mediada por la formación de vesículas de clatrina.



**Figura 24.** Internalización de Fluo-cortistatina en cultivos primarios de neuronas de corteza murina. Los cultivos se incubaron con 5  $\mu$ M de Fluo-cortistatina durante 30 minutos (A) y 1 minuto (B). En un experimento diferente, las células se trataron previamente con un inhibidor de la endocitosis llamado PAO (1  $\mu$ M, 30 min) y luego, se añadió la Fluo-cortistatina (5  $\mu$ M, 30 min; C). Se muestra, del mismo campo, la distribución de la Fluo-cortistatina (fluorescencia verde), la tubulina neuronal detectada gracias al uso del anticuerpo policlonal 334 (fluorescencia roja) y los núcleos (DAPI). La barra de calibración equivale a 20  $\mu$ m.



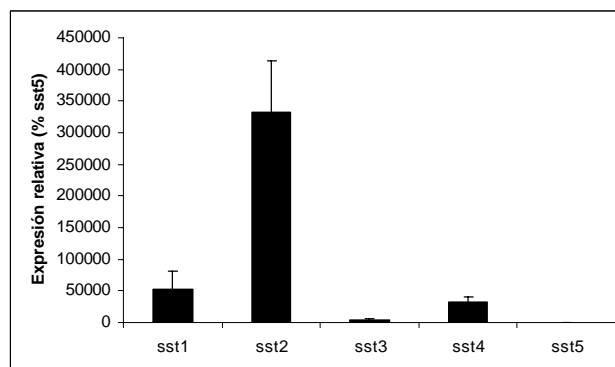
## **2.6. Las neuronas corticales en cultivo expresan los cinco subtipos de receptores de somatostatina**

Como se ha visto en los experimentos anteriores, la somatostatina es capaz de evitar la unión de la Fluo-cortistatina a los receptores presentes en las neuronas corticales en cultivo, parece pues lógico pensar que la cortistatina se une a los receptores de somatostatina de estas neuronas. De modo que para determinar qué subtipo de receptor de somatostatina es responsable de la unión de cortistatina en las neuronas, realizamos una PCR cuantitativa específica para cada subtipo de receptor de somatostatina (sst1-5). Utilizando el reactivo de PCR *SYBR Green*, como viene descrito en el apartado de materiales y métodos, obtuvimos una curva de amplificación para cada subtipo de receptor de somatostatina. Los datos normalizados con los obtenidos a raíz de la amplificación de la  $\beta$ -actina determinaron el nivel de expresión de los genes de interés.

Los resultados de la PCR cuantitativa, resumidos en la figura 25, muestran que las neuronas corticales murinas expresan transcritos para los cinco subtipos de receptores de somatostatina. El mRNA del receptor sst2 es el más abundante (aproximadamente diez veces más que los mRNA de sst1 y sst4) seguido por el mRNA de sst1 y el de sst4. La cantidad de receptor sst3 expresada en las neuronas corticales es menos relevante (representa alrededor de un 1% respecto al de sst2). Finalmente, el receptor sst5 es el menos expresado puesto que sólo se detecta después de 30 ciclos de amplificación (menos de un 0.1% respecto a sst3).

Como ya se ha indicado, la unión de cortistatina a los receptores celulares resulta en su internalización (figura 24), de modo que parece improbable que el receptor sst1 medie este efecto puesto que está descrito que la tasa de internalización de este receptor es baja (Hofland & Lamberts, 2003). Dejando a un lado este receptor y centrándonos en los más abundantes, quisimos comprobar si los receptores sst2 y sst4 eran responsables del efecto de cortistatina sobre la fosforilación de tau en la Ser262.



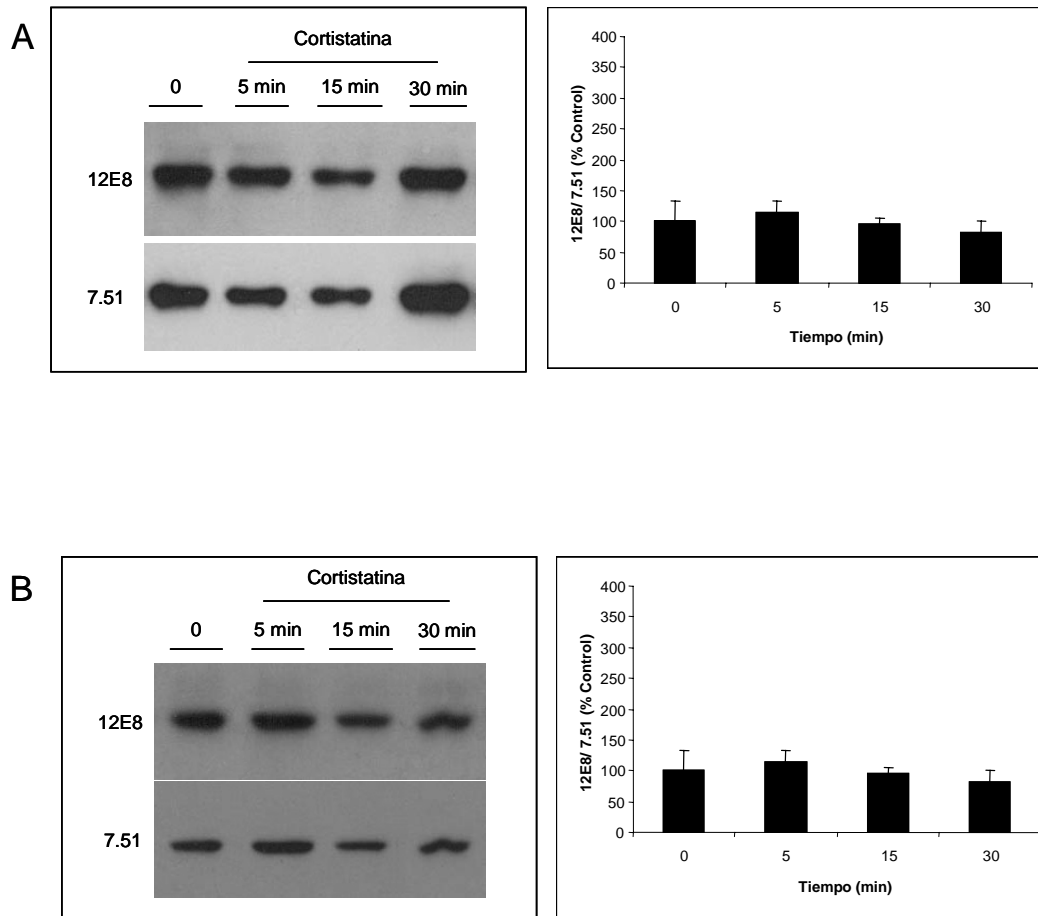


**Figura 25.** Niveles de expresión de los distintos subtipos de receptores de somatostatina (sst1-5) a partir de RNA purificado de neuronas de corteza murina en cultivo (PCR cuantitativa). Aparecen los valores de la media de los ciclos de amplificación umbral ( $C_T$ ) para cada receptor sst1-5 normalizados con el  $C_T$  de  $\beta$ -actina murina. Todos los datos presentados se expresan como  $1/C_T$  y se refieren al 100% de sst5 ( $n = 3 \pm$  desviación estándar).

## 2.7. Los receptores sst2 y sst4 están implicados en el efecto de la cortistatina sobre la fosforilación de tau en la Ser262

Para determinar los subtipos de receptores de somatostatina responsables del aumento de la fosforilación de tau en la Ser262 inducida por la cortistatina, estudiamos las neuronas corticales en cultivo de distintas cepas de ratón deficientes en receptores de somatostatina de los subtipos 2 y 4: (1) sst2  $-/-$ , (2) sst4  $-/-$  y (3) sst2/4  $-/-$ . Del mismo modo que en los experimentos anteriores (figura 20 A), se incubaron las células en presencia de 50 nM de cortistatina durante 5, 15 y 30 minutos tras 2 horas en NB sin suero, y, más tarde, analizamos por *western blot* la fosforilación de tau en la Ser262 usando el anticuerpo 12E8 y los niveles totales de tau utilizando el anticuerpo 7.51. Como se muestra en la figura 26, los tratamientos con cortistatina en las neuronas procedentes de los ratones sst2  $-/-$  y sst4  $-/-$  no inducen un aumento significativo en la fosforilación de tau en el sitio de la Ser262. Se encontraron resultados similares en el caso de los cultivos obtenidos de animales sst2/4  $-/-$  (datos no mostrados).

En conclusión, estos resultados sugieren que el efecto de la cortistatina sobre la fosforilación de tau en la Ser262 está mediado, al menos en parte, por los receptores sst2 y sst4.



**Figura 26.** La cortistatina no afecta a la fosforilación de tau en la Ser262 en cultivos de neuronas realizados a partir de cortezas de ratones *sst2*<sup>-/-</sup> y *sst4*<sup>-/-</sup>. (A) Se incubaron las células *sst2*<sup>-/-</sup> en presencia de cortistatina (50 nM, 5, 15 y 30 min). Seguidamente, se realizaron *western blots* usando los anticuerpos 12E8 (reconoce la Ser262 fosforilada de tau) y 7.51 (tau total). La cuantificación en unidades arbitrarias (a la derecha) se realizó por densitometría de los *western blots* anteriores. Los niveles de fosforilación de tau en la Ser262 se normalizaron con los de tau total ( $n = 3 \pm$  la desviación típica). (B) Se realizó un experimento similar al anterior pero, esta vez, con neuronas *sst4*<sup>-/-</sup>.

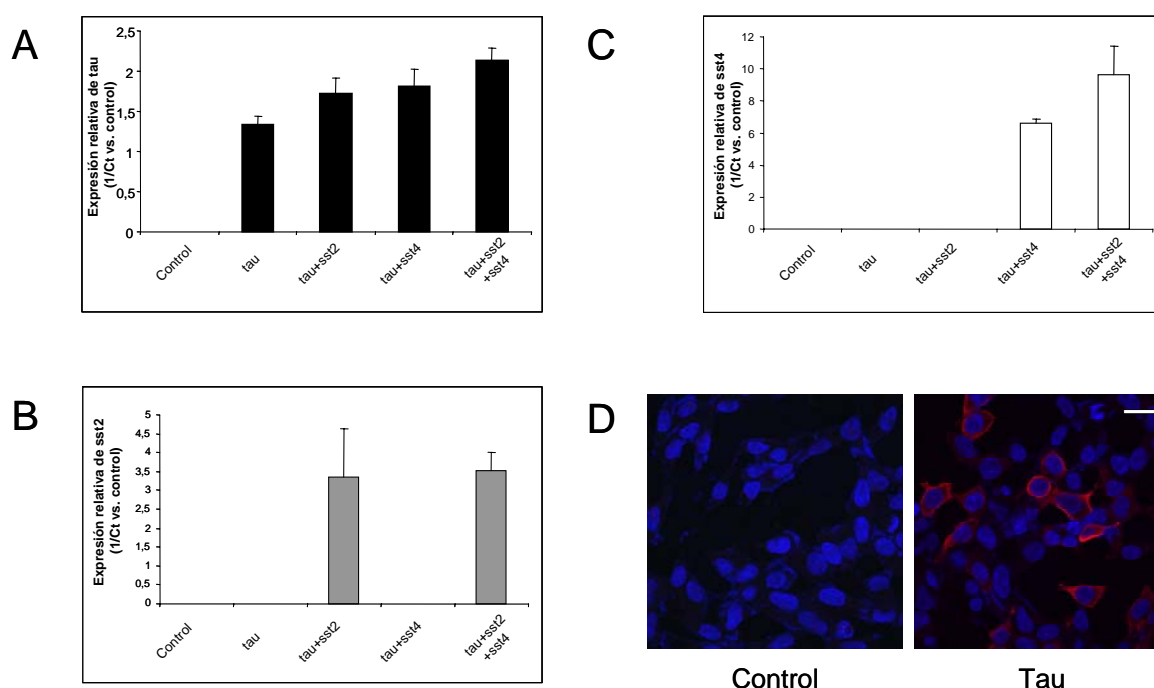
## 2.8. La cortistatina incrementa la fosforilación de tau en la Ser262 probablemente a través de su unión a receptores heterodiméricos compuestos por sst2 y sst4

Para desvelar qué subtipo/s de receptor/es de somatostatina es/son responsable/s del efecto de la cortistatina sobre la fosforilación de tau en la Ser262, realizamos tratamientos con cortistatina en células HEK-293 transfectadas de forma transitoria. Como se indica en la sección de materiales y métodos, transfectamos con varias combinaciones de tres plásmidos distintos compuestos por el vector pcDNA 3.1 y el inserto de cDNA de tau, sst2 o sst4 en cada caso. Las transfecciones transitorias realizadas fueron las siguientes: (1) tau, (2) tau y sst2, (3) tau y sst4 y (4) con los tres plásmidos (tau, sst2 y sst4).

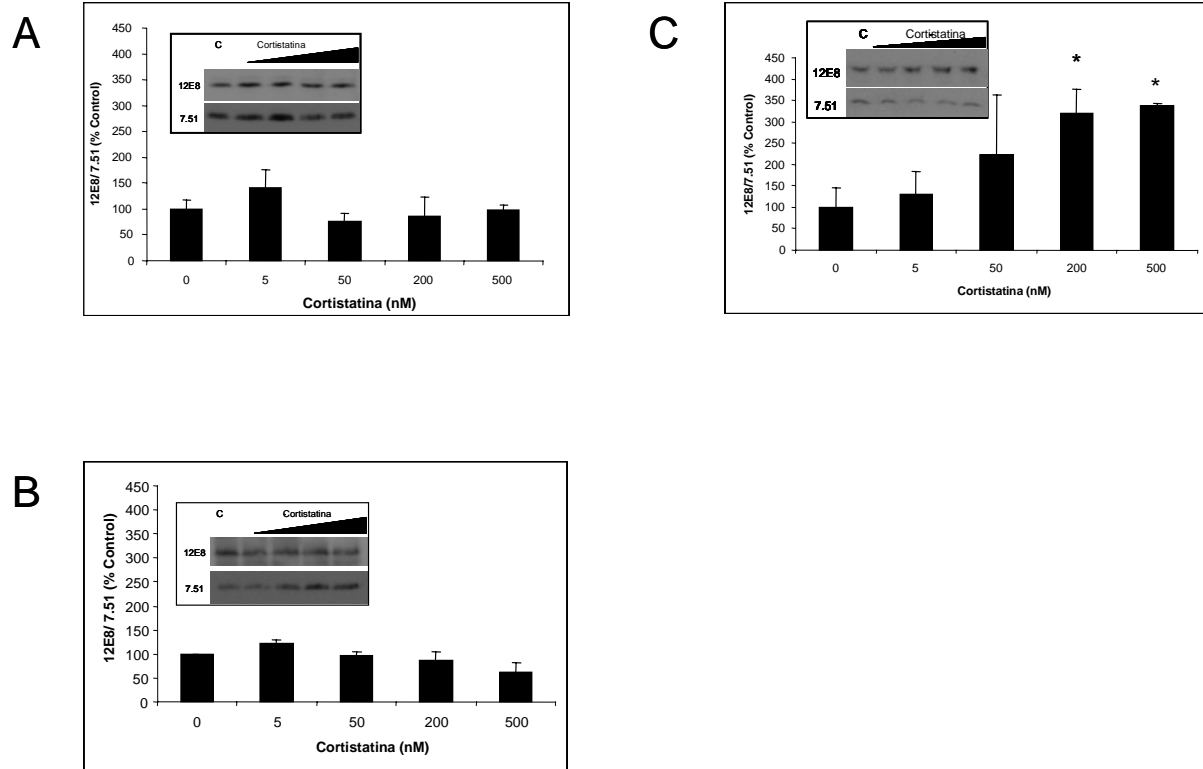
En un primer momento, quisimos comprobar si las células HEK-293 transfectadas de forma transitoria expresaban los transgenes. Por un lado, usando la técnica de PCR cuantitativa con el reactivo *SYBR Green*, observamos que tau, sst2 y sst4 se expresan cuando se transfectan (figura 27 A-C). Por otro lado, comprobamos que la proteína tau se expresa en las HEK-293 transfectadas con el cDNA de tau en experimentos de inmunofluorescencia con el anticuerpo tau 1 que reconoce tau (figura 27 D). De igual forma confirmamos la expresión de tau en las HEK-293 transfectadas con el cDNA de tau y con el de sst2, sst4 y con ambos (datos no mostrados). La expresión de tau no se aprecia en células control transfectadas con el vector pcDNA 3.1 (figura 27 D).

Las células HEK-293 transfectadas de forma transitoria con (1) tau, (2) tau y sst2, (3) tau y sst4 y (4) tau, sst2 y sst4 se incubaron en presencia de distintas concentraciones de cortistatina (5, 50, 200 y 500 nM) durante 30 minutos. Se analizaron los extractos proteicos correspondientes mediante *western blot* utilizando el anticuerpo 12E8 que reconoce la Ser262 fosforilada de tau. La cortistatina no parece afectar de forma significativa a la fosforilación de tau en la Ser262 cuando se añadía a las HEK-293 transfectadas con sólo tau (datos no mostrados), con tau y sst2 o con tau y sst4 (figura 28 A y B). Por el contrario, los tratamientos con 200 nM o 500 nM de cortistatina producen un aumento significativo en la fosforilación de tau en la Ser262 en las HEK-293 transfectadas con tau, sst2 y sst4 (figura 28 C;  $p < 0.05$ ). Estos experimentos sugieren que ambos receptores, sst2 y sst4, son necesarios para mediar el efecto de la cortistatina sobre la fosforilación de tau en la Ser262.

De igual forma, tratamos las células HEK-293 transfectadas de forma transitoria con diferentes concentraciones de somatostatina (de 5, 50, 200 y 500 nM) durante 5 minutos. En este caso, a diferencia del tratamiento con cortistatina, la somatostatina no induce un efecto significativo en la fosforilación de la Ser262 de tau (datos no mostrados) en las HEK-293 transfectadas con (1) tau, (2) tau y sst2, (3) tau y sst4 y, por último, (4) con los tres plásmidos (tau, sst2 y sst4). Parece que la cortistatina y la somatostatina median su efecto sobre la fosforilación de tau en la Ser262 por diferentes mecanismos.



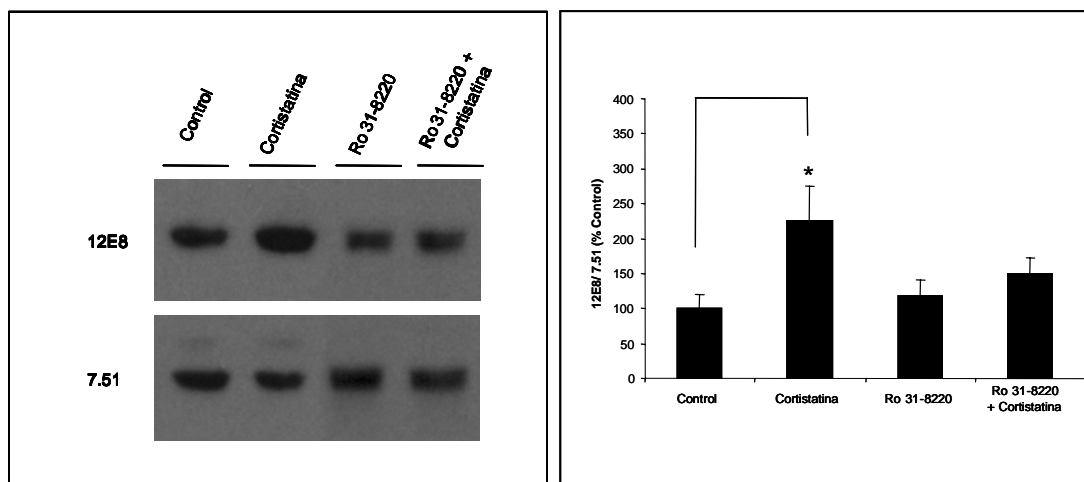
**Figura 27.** Expresión de tau, sst2 y sst4 en las células HEK-293 transfectadas de forma transitoria con tau, sst2 y sst4. Datos de la PCR cuantitativa para detectar los niveles de expresión de tau (A), de sst2 (B) y de sst4 (C) en las transfecciones transitorias siguientes: (1) tau, (2) tau+sst2, (3) tau+sst4 y (4) tau+sst2+sst4. Como control, transfectamos en las mismas condiciones el vector vacío pcDNA 3.1. Los resultados, normalizados usando los datos de la  $\beta$ -actina humana, se presentan como  $1/C_T$  respecto al control ( $n = 3 \pm$  desviación estándar). (D) Células HEK-293 transfectadas con pcDNA 3.1 (control, a la izquierda) o con tau (a la derecha) analizadas por inmunofluorescencia con un anticuerpo frente a tau (tau 1; fluorescencia roja) y tinción con DAPI (azul). La barra equivale a 20  $\mu$ m.



**Figura 28.** Fosforilación de la proteína tau en la Ser262 en las células HEK-293 transfectadas de forma transitoria con tau, sst2 y sst4. Tratamos las HEK-293 transfectadas con tau+sst2 (A), tau+sst4 (B) y tau+sst2+sst4 (C) con distintas concentraciones de cortistatina (5 nM, 50 nM, 200 nM y 500 nM) durante 30 minutos. Los extractos se analizaron por *western blot* para reconocer la Ser262 fosforilada de tau (anticuerpo 12E8) y tau total (7.51). La cuantificación por densitometría en unidades arbitrarias de los niveles de fosforilación de tau en la Ser262 se normalizó con la de tau total. Se representan las medias de los datos por triplicado  $\pm$  la desviación típica. \* $p < 0.05$  respecto al control sin cortistatina.

## 2.9. La PKC fosforila a la proteína tau en la Ser262 en presencia de cortistatina en neuronas corticales murinas

La PKC puede fosforilar a la proteína tau en, al menos, 4 sitios distintos de la molécula situados en el dominio de unión a tubulina (Correas et al., 1992). Una de estas secuencias contiene la Ser262, el epítipo reconocido por el anticuerpo 12E8 (Gomez-Ramos et al., 2003; Xiao-Chuan et al., 2004). Con objeto de comprobar si la PKC está implicada en la fosforilación de tau en la Ser262 inducida por cortistatina, tratamos los cultivos de neuronas corticales murinas con Ro 31-8220, un inhibidor de la PKC. En algunos casos, añadimos al medio cortistatina (50 nM, 30 min), como hicimos en los experimentos anteriores, y en otros, realizamos una pre-incubación con Ro 31-8220 (10  $\mu$ M, 60 min), y después agregamos o no cortistatina. Los resultados de la figura 29 muestran que el incremento de la fosforilación de tau en la Ser262 inducido por cortistatina no se observa en presencia de Ro 31-8220 sugiriendo que la cortistatina activa a la PKC y que ésta fosforila a tau en la Ser262.



**Figura 29.** La PKC está implicada en el incremento de la fosforilación de tau en la Ser262 por la cortistatina en cultivos de neuronas de corteza. Se realizaron los siguientes tratamientos: (1) 50 nM de cortistatina 30 min, (2) 10  $\mu$ M de Ro 31-8220, un inhibidor de la PKC, 90 min, (3) un pre-tratamiento con 10  $\mu$ M de Ro 31-8220 60 min seguido por, 50 nM de cortistatina 30 min. Los extractos proteicos se analizaron mediante *western blot* utilizando el anticuerpo 12E8 para detectar la fosfoSer262 de tau y el 7.51, que reconoce tau independientemente de su estado de fosforilación. Posteriormente, se realizó la cuantificación (panel de la derecha) por densitometría de los niveles de fosforilación de tau en la Ser262. Estos datos, en unidades arbitrarias, se normalizaron con los de tau total ( $n = 3 \pm$  la desviación típica). \* $p < 0.05$  comparado con el control tratado, en las mismas condiciones, con el vehículo.

---

## Discusión





Numerosas evidencias avalan la relevancia de la proteína tau en el desarrollo de la EA y de otras tauopatías. Por un lado, se considera que la presencia de NFT representa una marca histopatológica de estas enfermedades, y que éstas, pueden deberse en algunos casos, como las FTDP-17, a mutaciones puntuales en el gen que codifica para la proteína tau (Wang & Liu, 2008). Además, se ha visto que el número de NFT correlaciona con el grado de demencia de los pacientes con EA (Arriagada et al., 1992a; Arriagada et al., 1992b) y que la distribución de la patología neurofibrilar en la EA sigue un patrón anatómico característico que también se asocia con el grado de demencia del enfermo (Braak & Braak, 1991). En personas de edad avanzada, asintomáticos para la EA, se detecta la patología de tau en la corteza transentorrinal. Esta patología, en pacientes con MCI que presentan pérdida de memoria, se extiende a otras estructuras cerebrales como la corteza entorrinal y el hipocampo. En el caso de los enfermos de Alzheimer, los NFT invaden también el resto de la corteza.

En definitiva, estos trabajos relacionan la patología de tau con la progresión de la EA. Por tanto, uno de los objetivos fundamentales de esta tesis doctoral ha sido profundizar en los mecanismos moleculares que podrían explicar dicha relación tratando de estudiar el papel que juega tau en el avance de la enfermedad y en la atrofia cerebral debida a la muerte neuronal.

Por otra parte, también nos pareció importante estudiar la posible existencia de factores que determinasen el desarrollo de la patología de tau en la corteza cerebral. Este momento es clave en la progresión de la enfermedad puesto que determina el paso crítico del estado de “pérdida de memoria”, propia del MCI, al de “demencia” que caracteriza al enfermo de Alzheimer (Braak & Braak, 1991; Delacourte et al., 1999). El momento en el que la patología de tau pasa de la corteza entorrinal y el hipocampo a la corteza cerebral se conoce como “punto de no retorno”. En este trabajo, demostramos que la cortistatina, un neuropéptido que se expresa principalmente en la corteza, podría jugar un papel relevante en el desarrollo de la patología de tau en este área cerebral (de Lecea et al., 1996; de Lecea et al., 1997). La cortistatina podría constituir una señal endógena capaz de modular las actividades de las quinasas y las fosfatasa que afectan a la fosforilación de tau. A continuación discutiremos los puntos clave de esta tesis.

## **1. PAPEL QUE JUEGA TAU EN EL AVANCE DE LA EA**

### **1.2. La proteína tau extracelular induce un aumento en el calcio intracelular a través de M1 y M3**

En nuestro trabajo, observamos que la proteína tau induce un aumento en el calcio intracelular. Diversos estudios realizados previamente, indican que otras proteínas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas como la  $\alpha$ -sinucleína (Danzer et al., 2007), el  $\beta$ -amiloide o la proteína priónica (Demuro et al., 2005) alteran la homeostasis del calcio intracelular cuando se añaden a cultivos de neuronas. Sin embargo, los mecanismos que regulan esta alteración del calcio difieren según el tipo de proteína ensayada (Adamczyk & Strosznajder, 2006; Danzer et al., 2007; Gomez-Ramos et al., 2006). Basándonos en nuestros resultados sugerimos que la proteína tau induce cambios en el nivel intracelular de calcio a través de su interacción con los receptores muscarínicos. La activación de estos receptores provoca la liberación de calcio de los orgánulos intracelulares. De hecho, se han descrito otras proteínas capaces de interaccionar con receptores muscarínicos como el caso reciente de una glicoproteína vírica (Kumar et al., 2007). En primer lugar, para identificar qué receptor muscarínico sería capaz de unir tau, tuvimos que determinar qué subtipos de receptores se expresan en las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Como se mencionó en el apartado de resultados, los receptores M1, M2 y M3 son los más abundantes. Este patrón de expresión correlaciona bastante bien con lo que ocurre en el cerebro ((Piggott et al., 2002); <http://www.brain-map.org/>). M1 se expresa en gran cantidad en todo el cerebro, incluyendo las regiones más afectadas por la EA. El receptor M2 parece estar relacionado con la neurodegeneración puesto que se ha descrito su menor densidad en cerebros de pacientes con EA (Mash et al., 1985). Por último, el M3 se localiza en la corteza, el hipocampo y la formación retrohipocampal. De modo que podemos considerar a las SH-SY5Y como un buen modelo para estudiar el efecto de tau. Así que centramos nuestra búsqueda en los receptores M1, M2 y M3. Tras realizar distintos estudios farmacológicos y análisis mediante transfecciones transitorias, como se detalla en la sección de resultados, concluimos que M1 y M3 podrían ser responsables de la interacción con tau descartando así el papel de M2.

Por otra parte, diversas evidencias apuntan que existe una relación entre los receptores muscarínicos y el procesamiento del APP. Este procesamiento, de función desconocida por el momento, puede seguir dos vías. Se denomina vía no amiloidogénica a la ruta en la que actúan secuencialmente, la  $\alpha$ -secretasa primero y más tarde, la  $\gamma$ -secretasa. De este modo, se genera el largo dominio extracelular del APP ( $\alpha$ APPs) que tiene efectos neuroprotectores, un péptido pequeño (p3), que no forma agregados y el dominio intracelular del APP (AICD) (Hartmann et al., 2007). Por otro lado, en la vía amiloidogénica, la activación de la  $\beta$ -secretasa seguida de la  $\gamma$ -

secretasa da lugar al dominio extracelular del APP ( $\beta$ APPs), al péptido  $\beta$ -amiloide y al AICD. La  $\beta$ -secretasa comprende una familia de aspartil proteasas con, al menos, dos miembros altamente homólogos (BACE1, la mayoritaria en neuronas, y BACE2) (Hartmann et al., 2007). La  $\gamma$ -secretasa corta el APP en dos lugares alternativos: la valina 711 dando  $\beta$ -amiloide 40 o la alanina 713 generando  $\beta$ -amiloide 42 (Selkoe, 2001). Se ha visto que la activación de M1 y M3 promueve el procesamiento del APP por la vía no amiloidogénica (Nitsch et al., 1992). En cuanto a la relación entre la estimulación de los receptores muscarínicos y la vía amiloidogénica, se sabe que la activación de M1 conlleva un incremento en la expresión de BACE, sin embargo, la estimulación de M2 produce una disminución de su expresión (Zuchner et al., 2004; Zuchner et al., 2005). A pesar de estos datos, por el momento, en nuestro modelo, no hemos encontrado un efecto de tau sobre el procesamiento del APP.

## 1.2. La controversia en torno a la posible toxicidad de la proteína tau

Como se ha mencionado, la relevancia de la patología de tau en la progresión de la EA se demostró en los trabajos en los que se descubrió que el número de NFT y la progresión anatómica de la patología fibrilar correlacionan con el grado de demencia de los pacientes con esta enfermedad (Arriagada et al., 1992a; Arriagada et al., 1992b; Braak & Braak, 1991). Posteriormente, estudios de inmunohistoquímica mostraron que existe una relación inversa entre el número de ovillos fantasma y el número de neuronas vivas (Bondareff et al., 1989; Cras et al., 1995; Fukutani et al., 1995) sugiriendo que las neuronas que degeneran desarrollan previamente agregados de tau. Por el momento, sigue sin saberse si la relación entre la patología de tau y la muerte neuronal se debe a una pérdida de función de la proteína tau normal o a una ganancia de función de tau debida a su toxicidad.

Diversos datos apoyan la idea de la *pérdida de función de tau* como posible causante de la disfunción sináptica y la posterior neurodegeneración: la proteína tau, al separarse de los microtúbulos, deja de estabilizarlos pudiendo comprometer la morfología normal de la célula y otras funciones del citoesqueleto como el transporte axonal (Roy et al., 2005; Trojanowski et al., 2005). Con el tiempo, se forman los NFT y éstos podrían secuestrar más tau, amplificando así, la pérdida de la función normal de esta proteína. Se ha demostrado que el tau hiperfosforilado inhibe el ensamblaje de los microtúbulos en presencia de cualquier isoforma de tau desfosforilado y que causa la desestabilización de los microtúbulos previamente formados (Alonso et al., 2001). De igual forma, el tau fibrilar en PHF compromete la estabilidad de los microtúbulos resultando en un descenso del transporte axonal y dendrítico (Alonso et al., 1996; Salehi et al., 2003). En relación a esta hipótesis, el grupo de Trojanowski (2005) ha demostrado

que la administración de una droga (paclitaxel) capaz de estabilizar los microtúbulos mejora el deterioro motor de modelos murinos de tauopatías (Zhang et al., 2005). Este experimento destaca la relevancia de la integridad de la red de microtúbulos para evitar los síntomas asociados a la neurodegeneración.

Por otra parte, algunos trabajos realizados en ratones modificados genéticamente sostienen que la proteína tau no es esencial para el correcto funcionamiento de la célula, ya que su función podría verse complementada por otras proteínas. Por un lado, datos recientes demuestran que el transporte axonal no se ve afectado por la sobre-expresión o la falta de tau en la retina murina (Yuan et al., 2008). Además, conclusiones similares se han obtenido del estudio de dos líneas independientes de ratones que no expresan tau (Dawson et al., 2001; Harada et al., 1994). En ambos casos, observaron que los animales eran viables y que no presentaban grandes deficiencias fenotípicas (Dawson et al., 2001; Harada et al., 1994). La falta de tau podría estar compensada por una sobre-expresión de otras proteínas asociadas a microtúbulos como la MAP1A (Harada et al., 1994). En concreto, las únicas modificaciones morfológicas descritas fueron un retraso en la maduración axonal de neuronas en cultivo (Dawson et al., 2001) y, en la otra línea independiente de ratones, axones neuronales de menor calibre e hiperactividad (Harada et al., 1994; Ikegami et al., 2000). A pesar de esas diferencias, estudios recientes sugieren incluso que la supresión de tau podría ser beneficiosa para la EA. Se ha demostrado que los ratones modificados genéticamente que no expresan tau (Dawson et al., 2001) no presentan déficits de memoria o aprendizaje (Roberson et al., 2007). Además, los ratones que no expresan tau y sobre-expresan el APP humano mutado no muestran los déficits de memoria y aprendizaje presentados por el modelo de EA (Roberson et al., 2007). También se ha visto que las neuronas de hipocampo en cultivo obtenidas de ratones deficientes en tau (Dawson et al., 2001) no son susceptibles a la toxicidad inducida por el  $\beta$ -amiloide (Rapoport et al., 2002).

Por otro lado, existen evidencias a favor de la *ganancia de función tóxica de tau* como posible causa de la muerte neuronal. Es posible que los efectos tóxicos de los NFT puedan deberse, al menos en parte, a la disrupción física de las funciones celulares por la acumulación de agregados de proteína de gran tamaño en el interior celular (Ballatore et al., 2007). La toxicidad de los NFT también podría deberse a su capacidad de interacción con otras proteínas importantes para la función celular normal (Alonso et al., 1997).

Sin embargo, distintos trabajos sostienen que los NFT podrían ser agregados protectores frente a la neurodegeneración. Por un lado, se ha visto que las neuronas con NFT pueden sobrevivir durante décadas (Morsch et al., 1999). Y también se ha demostrado que no existe una asociación entre la morfología apoptótica, como la fragmentación de DNA, y la acumulación de tau (Broe et al., 2001). De igual forma, en otras enfermedades, como la enfermedad de Huntington, se ha visto que los agregados protegen frente a la degeneración (Arrasate et al.,

2004). En un modelo celular de Huntington, se demostró que la formación de los cuerpos de inclusión de huntingtina contribuía a la disminución de la muerte celular probablemente por retener la huntingtina libre (Arrasate et al., 2004). En el caso de la EA y el resto de tauopatías, se piensa que los agregados de tau podrían proteger a la neurona del ataque de las especies reactivas derivadas del oxígeno (revisado en (Lee et al., 2005)). Otra posibilidad es que los NFT sean protectores porque secuestran las especies tóxicas de tau soluble (Duff & Planel, 2005). Diversos trabajos han demostrado la existencia de especies de tau pre-fibrilares (Maeda et al., 2007; Maeda et al., 2006) que pueden encontrarse en el CSF de los enfermos de Alzheimer (Iqbal et al., 2005). Se ha sugerido que las estructuras implicadas en la neurodegeneración son los agregados intermedios de tau y no los PHF como se pensó en un principio (Duff & Planel, 2005). Primero, en un modelo de *Drosophila melanogaster* que sobre-expresa tau humano, se vio que la neurodegeneración ocurría a pesar de que los NFT no se formaban (Wittmann et al., 2001). Posteriormente, otro grupo confirmó esta idea en un modelo murino de tauopatía en el que sobre-expresaban el tau mutado (P301L) de forma condicional gracias al uso del promotor "tet-off" (Santacruz et al., 2005). En este trabajo, vieron que los déficits de memoria del ratón transgénico mejoraban si la expresión del transgén se interrumpía mediante administración de doxiciclina a pesar de que los NFT seguían acumulándose (Santacruz et al., 2005). Estos resultados sugieren que los déficits de memoria no están relacionados con la presencia de NFT y también se ven apoyados por las observaciones realizadas en individuos que padecen FTDP-17 debido a la mutación P301L (Bird et al., 1999). En esta tesis doctoral, mostramos que la presencia de la proteína tau causa la muerte de las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Su toxicidad podría deberse a que la interacción de tau con los receptores muscarínicos promueve un aumento del calcio intracelular. Como se detalla en el apartado de resultados, comprobamos que la proteína tau en PHF no altera los niveles de calcio intracelulares de las SH-SY5Y. Por el contrario, la estimulación con tau en forma monomérica induce un aumento sostenido en los niveles de calcio intracelular. El efecto de tau sobre los niveles de calcio intracelular se prolonga más en el tiempo que en los tratamientos realizados con acetilcolina. Por tanto, basándonos en estos resultados, postulamos que esa distinción cinética es clave para la toxicidad celular. Pensamos que podría deberse a que la acetilcolina altera la homeostasis del calcio intracelular debido a su interacción con los receptores muscarínicos y nicotínicos, en cambio, en el caso de tau, se debe a la activación de los receptores muscarínicos, concretamente, del M1 y del M3. Por último, mostramos que un fragmento de la zona carboxilo-terminal de tau, que comprende los residuos 391-407, es suficiente para inducir el efecto de tau sobre la movilización de calcio en las células COS-7 transfectadas transitoriamente con M3.

Aunque los agregados sean protectores para la célula en un principio, las consecuencias a largo plazo de estas inclusiones intracelulares son probablemente perjudiciales porque pueden

llegar a ocupar un gran espacio en el interior celular. Por tanto, es muy probable que ambos mecanismos -pérdida de función y, sobre todo, la ganancia de función tóxica de tau- contribuyan a la neurodegeneración en el inicio y la progresión de la EA y otras tauopatías especialmente en diferentes estadios de la enfermedad.

### **1.3. Modelo de propagación de la EA por toxicidad de la proteína tau extracelular**

Los datos obtenidos en cuanto a la toxicidad de la proteína tau extracelular en forma monomérica podrían ser relevantes para explicar la propagación de la EA.

En condiciones fisiológicas, la proteína tau se encuentra, en su mayoría, unida a los microtúbulos (Gamblin et al., 2003; King et al., 1999; Reynolds et al., 2005). Sin embargo, en condiciones patológicas, tau puede sufrir diversas modificaciones post-traduccionales como hiperfosforilación, truncación o desamidación (Avila et al., 2004; Gong et al., 2005; Wang & Liu, 2008). Estas modificaciones pueden inducir una liberación de tau de los microtúbulos acumulándose así tau monomérico. A partir de una concentración crítica, que según se ha visto debe sobrepasar 0.5  $\mu$ M, la proteína tau comienza a agregarse en el interior celular formando PHF (Reynolds et al., 2005). En el momento en que estas neuronas degeneran, su contenido celular queda libre en el espacio extracelular pudiendo encontrar tau en forma monomérica y PHF. Como vimos, la proteína tau extracelular en forma monomérica puede resultar tóxica para las células vecinas. A su vez, la muerte de estas células permitiría la liberación de tau extracelular extendiéndose así el efecto tóxico de tau en las inmediaciones. Este modelo podría explicar la propagación de la patología de tau que empieza en la estructura cerebral de la corteza entorrinal (Braak & Braak, 1991) y luego avanza al resto de áreas.

Como hemos visto en este trabajo, la toxicidad de tau depende de su interacción con los receptores muscarínicos M1 y M3. De hecho, en la EA, se ha descrito un incremento de M1 y M3 respecto a M2 (Mash et al., 1985). De este modo, la proteína tau podría actuar sobre M1 y M3 aunque las neuronas estén dañadas. La activación de estos receptores parece suponer una alteración de la homeostasis de los niveles de calcio intracelular. Esta alteración podría resultar en un aumento de la fosforilación de tau, modificación, que como hemos mencionado, está relacionada con la EA (Braak & Braak, 1991; Delacourte et al., 1999). La fosforilación de tau podría deberse a la activación de quinasas dependientes de calcio, como la PKC (Correas et al., 1992; Gomez-Ramos et al., 2003) o CDK5 (Hosoi et al., 1995), y facilitaría la liberación de tau de los microtúbulos (Biernat et al., 1993; Biernat & Mandelkow, 1999; Drewes et al., 1995; Liu et al., 2007; Wang et al., 2007).

## **2. PAPEL DE LA CORTISTATINA EN EL PASO DE LA PATOLOGÍA DE TAU A LA CORTEZA CEREBRAL**

### **2.1. La cortistatina induce la fosforilación de tau en la Ser262**

En este trabajo, realizado en cultivos primarios de neuronas corticales, demostramos que la cortistatina promueve la fosforilación de tau en la Ser262 de un modo dependiente de la concentración de cortistatina, con una saturación del efecto a 50 nM. Cabe destacar que en estudios realizados con cortistatina fluorescente, aproximadamente un 24% de las neuronas en cultivo mostraron internalización del ligando. De modo que el efecto de la cortistatina podría ser, al menos, cuatro veces mayor que el observado en una población celular mixta. La cortistatina induce un aumento en la fosforilación de tau en la Ser262, epítipo detectado por el anticuerpo 12E8, un sitio de fosforilación no dirigido por prolinas (Morishima-Kawashima et al., 1995). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la fosforilación de un sitio dirigido por prolinas: las Ser396 y Ser404 reconocidas por el anticuerpo PHF1 (Morishima-Kawashima et al., 1995).

Algunos trabajos señalan la relevancia de la fosforilación de tau en la Ser262 en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas. La fosforilación anómala en este residuo se detecta en los cerebros de pacientes con EA (Augustinack et al., 2002; Lauckner et al., 2003; Morishima-Kawashima et al., 1995) y otras tauopatías (Ferrer et al., 2002). También, se ha estudiado en modelos murinos de la EA (Perez et al., 2005; Puig et al., 2004). Las placas amiloides de los ratones transgénicos que sobre-expresan el APP humano mutado (APP<sup>Swe</sup>) se encuentran próximas a neuritas que contienen tau hiperfosforilado en la Ser262 (Puig et al., 2004). Posteriormente, se generaron ratones dobles transgénicos derivados del cruce del ratón anterior (APP<sup>Swe</sup>) con un ratón que sobre-expresa el tau humano mutado (tau<sup>VLW</sup>) (Perez et al., 2005). En estos ratones dobles transgénicos (APP<sup>Swe</sup>/ tau<sup>VLW</sup>) que reproducen la patología de tau y del  $\beta$ -amiloide se observó que la fosforilación de tau en la Ser262 correlaciona con un incremento en la formación de agregados filamentosos de tau. Estas estructuras muestran un diámetro similar al de los filamentos de tau descritos en la EA (Perez et al., 2005). Experimentos *in vitro*, demuestran que la fosforilación en la Ser262, situada en el dominio de unión a tubulina, reduce la unión de tau a los microtúbulos (Drewes et al., 1997; Drewes et al., 1995; Sengupta et al., 1998; Singh et al., 1996). De este modo, el tau fosforilado en la Ser262 queda libre en el citosol celular. En vez de favorecerse la formación de PHF, se ha visto que la fosforilación en la Ser262 inhibe la agregación de tau (Schneider et al., 1999; Schneider & Mandelkow, 2008), quedando el tau en forma monomérica, y dando lugar, tras la muerte neuronal, a la forma más tóxica de tau extracelular.

## 2.2. Receptores de somatostatina e internalización

Como indicamos, debido a la fuerte similitud estructural entre cortistatina y somatostatina, la cortistatina se une *in vitro* a los cinco subtipos conocidos de receptores de somatostatina (sst1-5 según la nomenclatura de la IUPHAR (Hoyer et al., 1995)) con igual afinidad (Criado et al., 1999; de Lecea et al., 1996; Fukusumi et al., 1997; Siehler et al., 1998). Distintos estudios han mostrado que la interacción de la somatostatina o sus análogos con los receptores de somatostatina suele provocar la internalización del complejo ligando-receptor induciendo una disminución de la respuesta del receptor gracias a un mecanismo conocido como desensibilización (Csaba & Dournaud, 2001; Olias et al., 2004; Tulipano & Schulz, 2007). Los receptores que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G sufren este proceso de forma habitual. La internalización puede depender del tiempo de exposición, la concentración del ligando y la regulación por distintas rutas de señalización intracelular (Hofland & Lamberts, 2003). Tras la unión del ligando y la activación del receptor, la señalización asociada se interrumpe: primero, los receptores quinasa acoplados a proteínas G (GRK) fosforilan los dominios intracelulares del receptor y, más tarde, las arrestinas, proteínas citoplásmicas, interrumpen la unión entre el receptor y la proteína G heterotrimérica (Gnagey et al., 1999; Oakley et al., 2000). Este mecanismo suele ir seguido por la endocitosis o internalización del complejo receptor/ligando mediante vesículas recubiertas de clatrina, siendo esta molécula clave para la regulación negativa y resensibilización del receptor (Bohm et al., 1997; Koenig & Edwardson, 1997). Las  $\beta$ -arrestinas, que también sirven de proteínas de carga, unen el receptor a los componentes de la maquinaria endocítica como AP-2 o clatrina (Pierce et al., 2001). Sin embargo, las arrestinas no median la endocitosis de todos los receptores acoplados a proteínas G (Zhang et al., 1996). Dentro del compartimento ácido endosomal, el ligando se disocia del receptor y este último se desfosforila por fosfatasaes específicas permitiendo que el receptor sea reciclado de nuevo en la membrana plasmática (Shenoy & Lefkowitz, 2003; Shenoy et al., 2001).

No todos los subtipos de receptores de somatostatina internalizan de la misma forma tras la unión del agonista (Csaba & Dournaud, 2001; Olias et al., 2004; Tulipano & Schulz, 2007). En resumen, la internalización provocada por la presencia del agonista parece ser menos eficiente en el caso de sst1 según distintos experimentos realizados con células COS-7 y CHO-K1 transfectadas establemente con distintos subtipos de receptores de somatostatina humanos (Hofland & Lamberts, 2003). Muchos estudios muestran que las dos isoformas de sst2 sufren desensibilización e internalización tras la unión de un agonista en diversas líneas celulares y tejidos (Boudin et al., 2000; Csaba & Dournaud, 2001; Hipkin et al., 1997; Liu et al., 2005; Vanetti et al., 1993), pero no ocurre lo mismo en presencia de antagonistas de sst2 (Cescato et al., 2006).



El grado de fosforilación del receptor parece ser relevante en el proceso de internalización: el receptor sst2 humano presente en tumores neuroendocrinos se encuentra preferentemente en la superficie celular si está desfosforilado (Liu et al., 2003). Cabe destacar que distintos estudios sugieren que el receptor sst2a no entra en la ruta de degradación y se recicla en la membrana plasmática (Tulipano & Schulz, 2007). El receptor sst3 de humano y rata, como el sst2, se internaliza de forma eficiente tras la estimulación del agonista aunque, a diferencia de sst2, sólo se recicla en pequeña cantidad (Hukovic et al., 1996; Roosterman et al., 1997; Roth et al., 1997). En el caso de sst5, la unión de las  $\beta$ -arrestinas podría ser menos estable (Cescato et al., 2006). Nuestros datos parecen indicar que la cortistatina fluorescente internaliza en los cultivos primarios de neuronas corticales. Este proceso se ve reducido de forma significativa en presencia de somatostatina indicando que la cortistatina se une a los receptores de somatostatina en estos cultivos neuronales y que el complejo ligando-receptor se internaliza en la célula.

Al margen de los receptores de somatostatina, el receptor secretagogo de la hormona de crecimiento (GHSR1a) (Deghenghi et al., 2001) y un receptor de la familia de los genes relacionados con el oncogén *mas* (MrgX2) (Robas et al., 2003) han sido propuestos como receptores selectivos de cortistatina. Por un lado, se ha demostrado que la cortistatina-14 y la -17, pero no la somatostatina-14, se unen al receptor GHSR1a con afinidad similar a la grelina (Deghenghi et al., 2001). Sin embargo, el efecto de la cortistatina-14 no ha podido ser detectado cuando se inyectaba en ratas en las mismas condiciones en las que la grelina inhibe la secreción de ácido gástrico por activación de GHSR1a (Sibilia et al., 2006). La distribución cerebral del GHSR1a se centra en diversos núcleos hipotalámicos (Gnanapavan et al., 2002; Mitchell et al., 2001; Zigman et al., 2006). Por otro lado, el receptor humano MrgX2 acoplado a proteína G ha sido identificado como el primer receptor específico para cortistatina en humanos (Robas et al., 2003) y monos rhesus (Burstein et al., 2006). La cortistatina-14 y la -17, pero no la somatostatina-14, se unen a MrgX2 con alta afinidad (Criado et al., 1999). MrgX2 se encuentra mayoritariamente en neuronas sensoriales (Siehler et al., 2007). También se expresa en: hipotálamo, pituitaria, tiroides, pulmón, tracto gastroenteropancreático, testículos y ovarios (Allia et al., 2005). Y se han detectado niveles moderados de MrgX2 en grupos de neuronas de CA2, CA3 y CA4 del hipocampo. El problema es que este receptor no se observa en la corteza cerebral, sugiriendo que otro receptor debe ser responsable del efecto de la cortistatina sobre el sueño, y tampoco se detecta un ortólogo de este receptor en roedores (de Lecea & Castano, 2006). Además, se ha demostrado que MrgX2 puede unirse con alta afinidad a otros péptidos *in vivo*, como los péptidos proadrenomedulina amino-terminal (Kamohara et al., 2005). Estos péptidos y la cortistatina parecen unirse al receptor MrgX2 en el mismo sitio gracias a un motivo estructural interno común centrado en torno a un octapéptido que alterna aminoácidos

aromáticos y básicos (Nothacker et al., 2005). En definitiva, la relevancia funcional de ambos receptores en la corteza cerebral sigue siendo dudosa. De modo que, en esta tesis doctoral, decidimos limitar nuestro estudio a la presencia de receptores de somatostatina. Demostramos que las neuronas corticales murinas en cultivo expresan los cinco subtipos de receptores de somatostatina, siendo sst2 el más abundante, seguido por sst1 y sst4. Como ya se ha indicado, la unión de cortistatina a los receptores celulares provoca su internalización, de modo que parece improbable que el receptor sst1 medie este efecto puesto que está descrito que la tasa de internalización de este receptor es baja (Hofland & Lamberts, 2003). Dejando a un lado este receptor, nos centramos en los más abundantes: sst2 y sst4. Por último, cabe destacar que los receptores putativos de cortistatina podrían también encontrarse en la familia de receptores de somatostatina. Estudios preliminares del grupo del Dr. Castaño indican que la cortistatina se une con alta afinidad a una isoforma humana del receptor truncado de sst5 (de Lecea & Castano, 2006).

### **2.3. Receptores de somatostatina y heterodimerización**

A pesar de que en un principio se pensó que los receptores acoplados a proteínas G actuaban siempre como monómeros, más tarde se demostró que estos receptores, incluyendo los receptores de somatostatina, interaccionan para formar dímeros e incluso entidades multiméricas que presentan un grado mayor de complejidad. La dimerización de los receptores parece ocurrir constitutivamente en el retículo endoplasmático justo después de la síntesis del receptor mediante un mecanismo todavía por precisar que probablemente implica chaperonas como la proteína de choque térmico 70 (Hsp70), la proteína que modifica la actividad del receptor (RAMP) o la 14-3-3 (Bulenger et al., 2005). La formación de dímeros podría ser un requisito para la localización sub-celular precisa del receptor (Bulenger et al., 2005).

El receptor sst2 es el receptor de somatostatina más abundante y también, el más estudiado en distintas líneas celulares. Combinando las técnicas de inmunoprecipitación y de FRET, se ha visto que el receptor humano sst2 transfectado en las líneas celulares CHO-K1 y HEK-293 forma homodímeros constitutivamente con una eficiencia en torno al 12% (Grant et al., 2004a). De igual forma, se ha demostrado la existencia de homodímeros del receptor sst2 en rata (Pfeiffer et al., 2001) y en cerdo (Duran-Prado et al., 2007). La respuesta de los dímeros de sst2 frente a la activación con somatostatina depende de la especie de origen del receptor: los dímeros de sst2 de rata no se ven afectados (Pfeiffer et al., 2001), en cambio, los de humano disminuyen de forma irreversible tras un tratamiento con somatostatina (Grant et al., 2004a) y los porcinos presentan una disminución reversible que tan sólo dura unos segundos (Duran-Prado et al., 2007). La homodimerización varía según el subtipo de receptor estudiado. En el

caso del receptor humano sst5 y, en contra de lo habitual para los receptores acoplados a proteínas G, se sabe que sst5 no dimeriza de forma constitutiva tras su síntesis pero sí dimeriza e incluso oligomeriza en presencia de somatostatina, al contrario de lo que ocurre en el caso del receptor humano sst2 (Grant et al., 2004b). Diversos estudios usando técnicas de FRET, inmunoprecipitación y *western blot* muestran que sst1 se sintetiza en forma monomérica y que este estado no se altera por la unión del ligando (Grant et al., 2004b; Patel et al., 2002). La dinámica de dimerización de sst3 de rata en las transfecciones de las HEK-293 parece ser similar a la descrita en el caso de sst2 de rata (Pfeiffer et al., 2001).

Los procesos de heterodimerización entre los receptores de somatostatina adquieren cierta relevancia fisiológica si se tiene en cuenta que distintos subtipos de receptores de somatostatina suelen expresarse en el mismo tipo celular con relativa frecuencia (Kreienkamp, 1999; Patel, 1999). Se ha visto que los receptores de somatostatina pueden mostrar heterodimerización en combinaciones específicas aumentando la complejidad del sistema y este fenómeno puede modificar sus propiedades funcionales y de unión (Rocheville et al., 2000a; Rocheville et al., 2000b). Por ejemplo, el receptor humano sst5 es capaz de formar heterodímeros con sst1, pero no con sst4 (Grant et al., 2004b; Patel et al., 2002; Rocheville et al., 2000b). En el caso de los receptores humanos sst1 y sst5 transfectados en células CHO-K1, se observó que la formación de heterodímeros modifica las propiedades de internalización, siendo la internalización de sst1 más eficiente si está formando un heterodímero con sst5 (Rocheville et al., 2000b).

La heterodimerización en rata de sst2a y sst3 resulta en la formación de un complejo proteico que mantiene las propiedades de unión de sst2 pero pierde la afinidad de los ligandos y las funciones específicas de sst3 (Pfeiffer et al., 2001). Durante una incubación prolongada con somatostatina-14, el heterodímero sst2a-sst3 se desensibiliza más lentamente que los homodímeros de sst2a y de sst3 (Pfeiffer et al., 2001). En este estudio, el octreotide, un análogo de somatostatina que se une preferentemente a sst2, sst3 y sst5, no induce un aumento significativo en la fosforilación de la Ser262 de tau en los cultivos primarios de neuronas corticales. Este dato sugiere que la activación de sst2, sst3 y sst5 probablemente no sea suficiente como para incrementar la fosforilación de tau en la Ser262. Apoyando esta idea, mostramos que la cortistatina no afecta a la fosforilación de tau en la Ser262 en las células HEK-293 transfectadas de forma transitoria con el cDNA que codifica para tau y sst2. Por el contrario, la cortistatina promueve la fosforilación de tau en la Ser262 en las HEK-293 transfectadas de forma transitoria con tau, sst2 y sst4 sugiriendo que el efecto de la cortistatina sobre la fosforilación de tau está mediado a través de receptores heterodiméricos formados por sst2 y sst4.

Por último, resulta importante destacar que los receptores de somatostatina no sólo interactúan entre ellos sino que también pueden asociarse con otros receptores acoplados a proteínas G. Se ha demostrado que el receptor murino sst2a y el receptor opioide  $\mu$  pueden heterodimerizar en las células HEK-293 (Pfeiffer et al., 2002). Esta interacción no parece afectar a sus propiedades de unión al ligando pero sí afecta a la co-internalización y desensibilización (Pfeiffer et al., 2002). Además, se mostró que el receptor humano sst5 y los receptores D2 pueden formar heterodímeros que influyen recíprocamente en su función (Rocheville et al., 2000a). La unión de un ligando a cualquiera de los dos receptores que forman el heterodímero produce una bajada en los niveles de AMPc mayor que en el caso de la activación de cualquiera de los receptores por separado (Rocheville et al., 2000a). La asociación dinámica entre los dos tipos de receptores puede inducirse al añadir dopamina o somatostatina. Ambos receptores co-localizan en la corteza cerebral, el estriado y el sistema límbico y la formación de heterodímeros con propiedades distintas a los homodímeros podría explicar las interacciones sinérgicas entre la dopamina y la somatostatina (Ferone et al., 2001; Izquierdo-Claros et al., 1997; Marzullo et al., 1999). Recientemente, se ha descrito que la presencia del ligando induce la interacción entre el receptor humano sst2 y D2 (Baragli et al., 2007). El heterodímero resultante presenta una mayor afinidad por la dopamina y sst2 muestra una mayor tasa endocítica (Baragli et al., 2007). Cabe destacar que la dimerización de los receptores se ha observado por el momento en sistemas recombinantes siendo necesaria la realización de experimentos en otros modelos (Siehler et al., 2007; Weckbecker et al., 2003).

#### **2.4. Receptores de somatostatina y señalización intracelular**

La somatostatina parece ejercer un efecto similar al de la cortistatina sobre la fosforilación de tau en la Ser262 en cultivos primarios de neuronas corticales, pero este efecto parece tener una cinética distinta. Las incubaciones de tiempos prolongados con somatostatina inducen una disminución en la fosforilación de tau en la Ser262. Esta alteración podría deberse a la activación de la PP2B o calcineurina, una fosfatasa capaz de desfosforilar específicamente el sitio de la Ser262 (Rahman et al., 2006). Las diferencias cinéticas entre los efectos provocados por la cortistatina y la somatostatina también han sido observadas en el efecto que inducen ambos péptidos sobre la depresión en la actividad neuronal de las células hipocámpales (de Lecea et al., 1996). De hecho, como se detalló en la introducción de este trabajo, la cortistatina parece ser funcionalmente distinta de la somatostatina. Se ha visto que la expresión de cortistatina no aumenta en los ratones deficientes en somatostatina (Ramirez et al., 2002) y, sin embargo, la expresión de los receptores de somatostatina aumenta en ese mismo modelo (Cammalleri et al., 2006; Ramirez et al., 2002).

Estas diferencias no pueden explicarse por las distintas conformaciones de los péptidos puesto que la cortistatina-14 y la somatostatina-14 no muestran una estructura secundaria preferencial en solución, según los datos de dicróismo circular y resonancia magnética (Criado et al., 1999). Los experimentos realizados con varios péptidos sintéticos concluyen que los aminoácidos exocíclicos de la cortistatina-14 (la Prolina amino-terminal y la Lisina carboxilo-terminal), distintos en la somatostatina-14, son esenciales para ejercer las actividades biológicas propias de la cortistatina (Criado et al., 1999). Otra posibilidad sería que la cortistatina activase vías de señalización distintas a la somatostatina: por ejemplo, la cortistatina-14, a diferencia de la somatostatina-14, activa la corriente H mediada por canales catiónicos activados por hiperpolarización (Schweitzer et al., 2003). Alternativamente, la cortistatina podría unirse a receptores con afinidad modificada por proteínas accesorias, como ocurre en el caso de las RAMP y las proteínas que interaccionan con receptores acoplados a proteínas G (GIP) con los receptores de adrenomedulina y calcitonina (Bockaert et al., 2004; Parameswaran & Spielman, 2006). También, podría modificar las propiedades de internalización de los receptores de somatostatina (Spier & de Lecea, 2000) o unirse con alta afinidad a receptores heterodiméricos (Agnati et al., 2003). Como hemos visto, nuestros datos parecen apoyar esta última posibilidad.

La proteína tau puede ser fosforilada en la Ser262 por diferentes quinasas como PKA (Scott et al., 1993), MARK (Drewes et al., 1997), CaMKinasa II (Bennecib et al., 2001), fosforilasa quinasa (Paudel, 1997), PK35/41 (Biernat et al., 1993) o PKC (Gomez-Ramos et al., 2003). Dado que la unión de la somatostatina a los receptores de somatostatina induce una disminución en la actividad de PKA (Schindler et al., 1996) pero activa la vía de la PLC-PKC (Ribalet & Eddlestone, 1995), estudiamos si la PKC podría fosforilar tau en la Ser262 en presencia de cortistatina. La PKC es responsable de la fosforilación de tau en los sitios no dirigidos por prolinas (Correas et al., 1992; Morishima-Kawashima et al., 1995; Singh et al., 1994) como la Ser262. Nuestros datos sugieren que la PKC media la fosforilación de tau en la Ser262 inducida por la cortistatina puesto que la adición de un inhibidor de la PKC (Ro 31-8220) al medio de cultivo de las neuronas corticales murinas evita el incremento en la fosforilación de la Ser262 en presencia de cortistatina.

## 2.5. La posible relación entre cortistatina y somatostatina con la EA

Diversos estudios describen cambios en la expresión de somatostatina y sus receptores en la EA. Por un lado, se ha visto que la concentración de somatostatina disminuye en el cerebro y en el CSF de pacientes con EA (Bissette et al., 1998; Davies et al., 1980; Nilsson et al., 2001). Por el momento, no se han estudiado los niveles de cortistatina en los cerebros de EA. Además, la expresión de los receptores de somatostatina sst4 y sst5 se ve reducida en la corteza cerebral de los pacientes con EA (Kumar, 2005). Este dato parece estar en contradicción con nuestros resultados, pero cabe recordar que la disminución en la densidad de estos receptores se estudió en estadios avanzados de la enfermedad. En nuestro trabajo, nos interesamos por los estadios tempranos donde la cantidad de sst4 debería estar poco afectada.

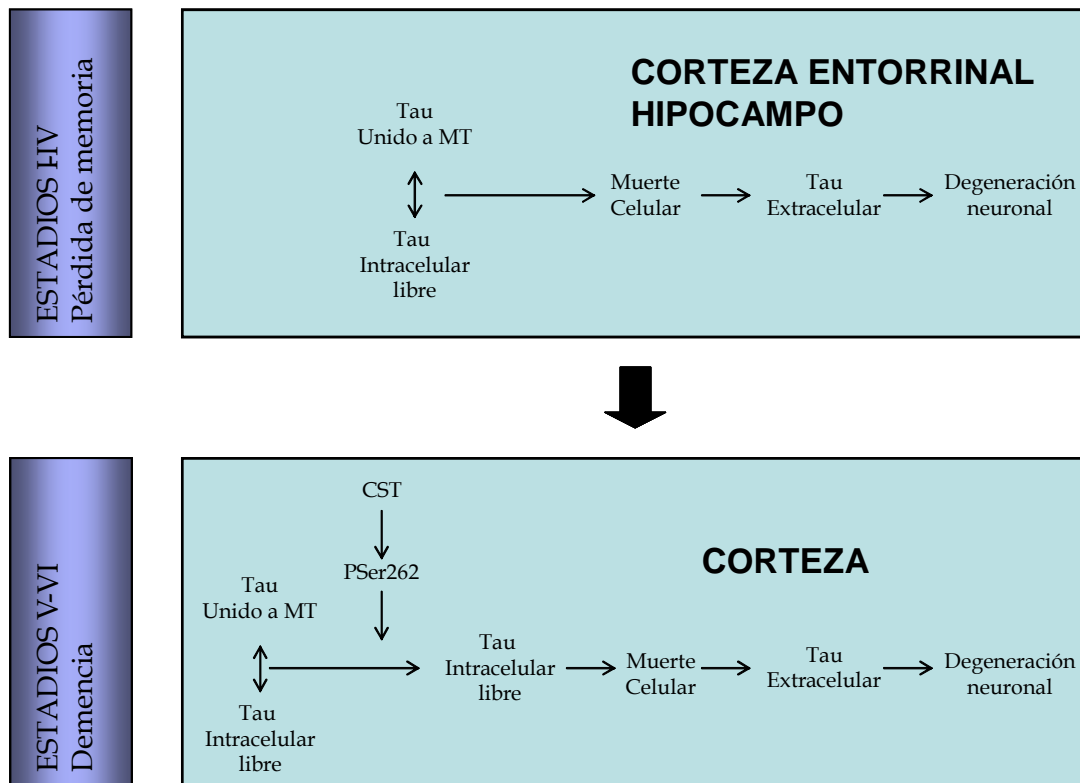
Por otro lado, la somatostatina podría estar relacionada con algunos aspectos de la patología del  $\beta$ -amiloide puesto que parece elevar de forma significativa la actividad de la neprilisina neuronal (Saito et al., 2005). Esta metaloproteasa es relevante en la degradación del  $\beta$ -amiloide *in vivo* (Iwata et al., 2000; Shirotani et al., 2001; Takaki et al., 2000). Entre sus sustratos, se incluyen tanto los oligómeros como los monómeros de  $\beta$ -amiloide 40 y 42 (Kanemitsu et al., 2003). De hecho, la actividad de la neprilisina podría tener un efecto diferencial sobre el  $\beta$ -amiloide 40 y 42. Se ha sugerido que el  $\beta$ -amiloide 40 es degradado mayoritariamente en el interior celular (pH de 5.0 en las vesículas de secreción) mientras que la degradación del  $\beta$ -amiloide 42 ocurre en torno a la superficie celular (pH de 7.2) (Iwata et al., 2001; Iwata et al., 2000).

Se ha visto que los niveles de expresión de la neprilisina se reducen de forma significativa en áreas del cerebro de pacientes con EA en estadios tempranos (Estadio Braak II) (Yasojima et al., 2001). Por tanto, se postula que, con la edad, la disminución de la expresión de somatostatina (Hayashi et al., 1997; Lu et al., 2004) provoca una reducción gradual en la actividad de la neprilisina que resulta en una elevación de los niveles de  $\beta$ -amiloide. De modo que el incremento de la actividad de la neprilisina mediante sobre-expresión utilizando la técnica de la terapia génica o mediante administración de análogos de somatostatina podría mejorar la patología del  $\beta$ -amiloide de un paciente con EA (Saido & Iwata, 2006). Por el momento, no se ha estudiado si la cortistatina es capaz de regular la actividad de la neprilisina. Tampoco se sabe cuál será el efecto de un tratamiento con somatostatina o sus análogos sobre la patología de tau.

Nuestros resultados sugieren que la cortistatina y la somatostatina promueven la fosforilación de tau en la Ser262 de las neuronas murinas corticales en cultivo. Como vimos, la EA está relacionada con la edad y se ha descrito que la expresión de la preprocortistatina aumenta de forma significativa durante el envejecimiento (Winsky-Sommerer et al., 2004). También se ha visto que los niveles de cortistatina aumentan progresivamente en la transición vigilia/sueño y, sobre todo, en situaciones de privación de sueño (Bourgin et al., 2007). Por tanto, el incremento de la cortistatina, con la edad o por falta de sueño, podría resultar en un aumento en la fosforilación de tau en la Ser262 que podría contribuir a la patología de tau descrita en la EA. El efecto de la somatostatina sobre la fosforilación de tau en la Ser262 parece ser menos importante para la EA puesto que los niveles de somatostatina disminuyen con la edad (Bissette et al., 1998; Davies et al., 1980; Nilsson et al., 2001), y la somatostatina induce un aumento de la actividad de neprilisina (Saito et al., 2005).

En este trabajo, mostramos, por un lado, que la fosforilación de tau en la Ser262 se ve reducida en la corteza de los ratones que no expresan cortistatina y, por otro, que la cortistatina promueve la fosforilación de tau en ese mismo residuo en cultivos primarios de neuronas corticales, probablemente a través de la activación de receptores de somatostatina heterodímeros compuestos por sst2 y sst4. De hecho, experimentos de inmunohistoquímica en cerebro de rata muestran un alto grado de co-localización entre sst2 y sst4 en la capa V de las neuronas piramidales presentes en la corteza pero no ocurre lo mismo en el hipocampo (Schreff et al., 2000). Este resultado apoya la idea de que el efecto de la cortistatina, mediado por sst2 y sst4, sólo se observe en la corteza y no en el hipocampo.

Por tanto, nuestra hipótesis es que, en la corteza cerebral de individuos de edad avanzada o con falta de sueño, la cortistatina podría inducir un aumento en la fosforilación de la Ser262 de tau. Esta modificación aberrante podría aumentar la concentración citosólica de tau libre en forma monomérica y podría resultar en una desestabilización de los microtúbulos pudiendo llegar a la degeneración neuronal. Como indicamos, el tau libre en forma monomérica quedaría en el medio extracelular pudiendo ser tóxico para las células vecinas. En definitiva, el efecto de la cortistatina sobre la fosforilación de tau en la Ser262 en la corteza cerebral podría jugar un papel relevante en la aparición de la demencia propia de la EA puesto que afecta al paso de la patología de tau desde la corteza entorrinal/hipocampo hasta la corteza cerebral (Braak & Braak, 1991) (figura 30).



**Figura 30. Representación esquemática de nuestra hipótesis sobre la progresión de la EA.** Se postula que la proteína tau extracelular en forma monomérica es tóxica e induce la degeneración neuronal en las primeras zonas afectadas por la EA (como la corteza entorrinal y el hipocampo). En las células, encontramos dos poblaciones distintas de tau: una en la que tau está unido a microtúbulos (MT) y otra en la que tau se encuentra fundamentalmente en forma monomérica. Esta última población es la más tóxica, tras degenerar la neurona y pasar al espacio extracelular. En la corteza, la cortistatina provoca un aumento en la fosforilación de tau en la Ser262, aumentando la proporción de tau libre en forma monomérica. Este proceso podría incrementar la toxicidad de la proteína tau extracelular en estadios más avanzados de la EA.



---

## Conclusiones



1. La proteína tau extracelular en forma monomérica es tóxica para las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. La toxicidad de tau depende de su concentración y del tiempo de incubación en el medio celular.
2. La proteína tau altera la homeostasis de calcio intracelular a través de su unión a los receptores muscarínicos M1 y M3. Proponemos que tau induce la muerte neuronal a través de este mecanismo molecular.
3. Un fragmento del extremo carboxilo terminal de tau, que comprende los residuos 391-407, es suficiente para inducir el incremento de calcio intracelular.
4. El efecto de la cortistatina sobre los niveles de fosforilación de tau en la Ser262 se limita a la corteza cerebral.
5. La cortistatina promueve la fosforilación de tau en la Ser262 en cultivos primarios de neuronas corticales murinas con distinta cinética. El efecto de la cortistatina podría deberse a su unión con receptores heterodiméricos compuestos por sst2 y sst4 y la consiguiente activación de PKC.
6. Se postula que la toxicidad de la proteína tau extracelular en forma monomérica podría explicar el avance de la enfermedad de Alzheimer y que el efecto de la cortistatina sobre la fosforilación de tau en la Ser262 podría incrementar la patología de tau en la corteza.



---

## Bibliografía



- Adamczyk, A. & Strosznajder, J.B. (2006) Alpha-synuclein potentiates Ca<sup>2+</sup> influx through voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuroreport*, **17**, 1883-1886.
- Agnati, L.F., Ferre, S., Lluís, C., Franco, R. & Fuxe, K. (2003) Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons. *Pharmacol Rev*, **55**, 509-550.
- Aizawa, H., Kawasaki, H., Murofushi, H., Kotani, S., Suzuki, K. & Sakai, H. (1989) A common amino acid sequence in 190-kDa microtubule-associated protein and tau for the promotion of microtubule assembly. *J Biol Chem*, **264**, 5885-5890.
- Alonso, A.C., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (1996) Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med*, **2**, 783-787.
- Alonso, A.D., Grundke-Iqbal, I., Barra, H.S. & Iqbal, K. (1997) Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 298-303.
- Alonso, A.D., Zaidi, T., Novak, M., Barra, H.S., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (2001) Interaction of tau isoforms with Alzheimer's disease abnormally hyperphosphorylated tau and in vitro phosphorylation into the disease-like protein. *J Biol Chem*, **276**, 37967-37973.
- Alonso Adel, C., Mederlyova, A., Novak, M., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (2004) Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *J Biol Chem*, **279**, 34873-34881.
- Alvarez, G., Munoz-Montano, J.R., Satrustegui, J., Avila, J., Bogonez, E. & Diaz-Nido, J. (1999) Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett*, **453**, 260-264.
- Allia, E., Tarabra, E., Volante, M., Cerrato, M., Ghigo, E., Muccioli, G. & Papotti, M. (2005) Expression of cortistatin and MrgX2, a specific cortistatin receptor, in human neuroendocrine tissues and related tumours. *J Pathol*, **207**, 336-345.
- Amos, L.A. (2004) Microtubule structure and its stabilisation. *Org Biomol Chem*, **2**, 2153-2160.
- Andersen, J.K. (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med*, **10 Suppl**, S18-25.
- Arai, H., Ishiguro, K., Ohno, H., Moriyama, M., Itoh, N., Okamura, N., Matsui, T., Morikawa, Y., Horikawa, E., Kohno, H., Sasaki, H. & Imahori, K. (2000) CSF phosphorylated tau protein and mild cognitive impairment: a prospective study. *Exp Neurol*, **166**, 201-203.
- Araujo, D.M., Lapchak, P.A., Collier, B. & Quirion, R. (1990) Evidence that somatostatin enhances endogenous acetylcholine release in the rat hippocampus. *J Neurochem*, **55**, 1546-1555.
- Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E.S., Segal, M.R. & Finkbeiner, S. (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, **431**, 805-810.

- Arrasate, M., Perez, M., Armas-Portela, R. & Avila, J. (1999) Polymerization of tau peptides into fibrillar structures. The effect of FTDP-17 mutations. *FEBS Lett*, **446**, 199-202.
- Arrasate, M., Perez, M. & Avila, J. (2000) Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane. *Neurochem Res*, **25**, 43-50.
- Arrasate, M., Perez, M., Valpuesta, J.M. & Avila, J. (1997) Role of glycosaminoglycans in determining the helicity of paired helical filaments. *Am J Pathol*, **151**, 1115-1122.
- Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T. & Hyman, B.T. (1992a) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*, **42**, 631-639.
- Arriagada, P.V., Marzloff, K. & Hyman, B.T. (1992b) Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease. *Neurology*, **42**, 1681-1688.
- Atzori, C., Ghatti, B., Piva, R., Srinivasan, A.N., Zolo, P., Delisle, M.B., Mirra, S.S. & Migheli, A. (2001) Activation of the JNK/p38 pathway occurs in diseases characterized by tau protein pathology and is related to tau phosphorylation but not to apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, **60**, 1190-1197.
- Augustinack, J.C., Schneider, A., Mandelkow, E.M. & Hyman, B.T. (2002) Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, **103**, 26-35.
- Avila, J., Lucas, J.J., Perez, M. & Hernandez, F. (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev*, **84**, 361-384.
- Axmacher, N., Elger, C.E. & Fell, J. (2008) Ripples in the medial temporal lobe are relevant for human memory consolidation. *Brain*, **131**, 1806-1817.
- Baas, P.W., Pienkowski, T.P., Cimbalka, K.A., Toyama, K., Bakalis, S., Ahmad, F.J. & Kosik, K.S. (1994) Tau confers drug stability but not cold stability to microtubules in living cells. *J Cell Sci*, **107** ( Pt 1), 135-143.
- Ballatore, C., Lee, V.M. & Trojanowski, J.Q. (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci*, **8**, 663-672.
- Banker, G.A. & Cowan, W.M. (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res*, **126**, 397-442.
- Baragli, A., Alturaihi, H., Watt, H.L., Abdallah, A. & Kumar, U. (2007) Heterooligomerization of human dopamine receptor 2 and somatostatin receptor 2 Co-immunoprecipitation and fluorescence resonance energy transfer analysis. *Cell Signal*, **19**, 2304-2316.
- Bartus, R.T., Dean, R.L., Goas, J.A. & Lippa, A.S. (1980) Age-related changes in passive avoidance retention: modulation with dietary choline. *Science*, **209**, 301-303.
- Baudier, J., Lee, S.H. & Cole, R.D. (1987) Separation of the different microtubule-associated tau protein species from bovine brain and their mode II phosphorylation by Ca<sup>2+</sup>/phospholipid-dependent protein kinase C. *J Biol Chem*, **262**, 17584-17590.



- Bennefib, M., Gong, C.X., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (2001) Inhibition of PP-2A upregulates CaMKII in rat forebrain and induces hyperphosphorylation of tau at Ser 262/356. *FEBS Lett*, **490**, 15-22.
- Bergeron, C., Pollanen, M.S., Weyer, L. & Lang, A.E. (1997) Cortical degeneration in progressive supranuclear palsy. A comparison with cortical-basal ganglionic degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*, **56**, 726-734.
- Bertram, L., McQueen, M.B., Mullin, K., Blacker, D. & Tanzi, R.E. (2007) Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet*, **39**, 17-23.
- Biedler, J.L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M. & Freedman, L.S. (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*, **38**, 3751-3757.
- Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E.M. & Mandelkow, E. (1993) Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron*, **11**, 153-163.
- Biernat, J. & Mandelkow, E.M. (1999) The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domains. *Mol Biol Cell*, **10**, 727-740.
- Bird, T.D. (2008) Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genet Med*, **10**, 231-239.
- Bird, T.D., Nochlin, D., Poorkaj, P., Cherrier, M., Kaye, J., Payami, H., Peskind, E., Lampe, T.H., Nemens, E., Boyer, P.J. & Schellenberg, G.D. (1999) A clinical pathological comparison of three families with frontotemporal dementia and identical mutations in the tau gene (P301L). *Brain*, **122** ( Pt 4), 741-756.
- Bissette, G., Cook, L., Smith, W., Dole, K.C., Crain, B. & Nemeroff, C.B. (1998) Regional Neuropeptide Pathology in Alzheimer's Disease: Corticotropin-Releasing Factor and Somatostatin. *J Alzheimers Dis*, **1**, 91-105.
- Blacker, D., Wilcox, M.A., Laird, N.M., Rodes, L., Horvath, S.M., Go, R.C., Perry, R., Watson, B., Jr., Bassett, S.S., McInnis, M.G., Albert, M.S., Hyman, B.T. & Tanzi, R.E. (1998) Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet*, **19**, 357-360.
- Blusztajn, J.K. & Berse, B. (2000) The cholinergic neuronal phenotype in Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis*, **15**, 45-64.
- Bockaert, J., Fagni, L., Dumuis, A. & Marin, P. (2004) GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol Ther*, **103**, 203-221.
- Bohm, S.K., Grady, E.F. & Bunnett, N.W. (1997) Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J*, **322** ( Pt 1), 1-18.
- Bondareff, W., Mountjoy, C.Q., Roth, M. & Hauser, D.L. (1989) Neurofibrillary degeneration and neuronal loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **10**, 709-715.

- Boudin, H., Sarret, P., Mazella, J., Schonbrunn, A. & Beaudet, A. (2000) Somatostatin-induced regulation of SST(2A) receptor expression and cell surface availability in central neurons: role of receptor internalization. *J Neurosci*, **20**, 5932-5939.
- Bourgin, P., Fabre, V., Huitron-Resendiz, S., Henriksen, S.J., Prospero-Garcia, O., Criado, J.R. & de Lecea, L. (2007) Cortistatin promotes and negatively correlates with slow-wave sleep. *Eur J Neurosci*, **26**, 729-738.
- Boyault, C., Zhang, Y., Fritah, S., Caron, C., Gilquin, B., Kwon, S.H., Garrido, C., Yao, T.P., Vourc'h, C., Matthias, P. & Khochbin, S. (2007) HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. *Genes Dev*, **21**, 2172-2181.
- Braak, H. & Braak, E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)*, **82**, 239-259.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brady, R.M., Zinkowski, R.P. & Binder, L.I. (1995) Presence of tau in isolated nuclei from human brain. *Neurobiol Aging*, **16**, 479-486.
- Brandt, R., Leger, J. & Lee, G. (1995) Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol*, **131**, 1327-1340.
- Braun, H., Schulz, S., Becker, A., Schroder, H. & Holtt, V. (1998) Protective effects of cortistatin (CST-14) against kainate-induced neurotoxicity in rat brain. *Brain Res*, **803**, 54-60.
- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J. & Guillemin, R. (1973) Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, **179**, 77-79.
- Breder, C.D., Yamada, Y., Yasuda, K., Seino, S., Saper, C.B. & Bell, G.I. (1992) Differential expression of somatostatin receptor subtypes in brain. *J Neurosci*, **12**, 3920-3934.
- Brioni, J.D., Decker, M.W., Gamboa, L.P., Izquierdo, I. & McGaugh, J.L. (1990) Muscimol injections in the medial septum impair spatial learning. *Brain Res*, **522**, 227-234.
- Broe, M., Shepherd, C.E., Milward, E.A. & Halliday, G.M. (2001) Relationship between DNA fragmentation, morphological changes and neuronal loss in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol*, **101**, 616-624.
- Buee-Scherrer, V. & Goedert, M. (2002) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases in intact cells. *FEBS Lett*, **515**, 151-154.
- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A. & Hof, P.R. (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev*, **33**, 95-130.
- Buerger, K., Teipel, S.J., Zinkowski, R., Blennow, K., Arai, H., Engel, R., Hofmann-Kiefer, K., McCulloch, C., Ptak, U., Heun, R., Andreasen, N., DeBernardis, J., Kerkman, D., Moeller, H., Davies, P. & Hampel, H. (2002a) CSF tau protein phosphorylated at threonine 231 correlates with cognitive decline in MCI subjects. *Neurology*, **59**, 627-629.

- Buerger, K., Zinkowski, R., Teipel, S.J., Tapiola, T., Arai, H., Blennow, K., Andreasen, N., Hofmann-Kiefer, K., DeBernardis, J., Kerkman, D., McCulloch, C., Kohnken, R., Padberg, F., Pirttilä, T., Schapiro, M.B., Rapoport, S.I., Møller, H.J., Davies, P. & Hampel, H. (2002b) Differential diagnosis of Alzheimer disease with cerebrospinal fluid levels of tau protein phosphorylated at threonine 231. *Arch Neurol*, **59**, 1267-1272.
- Bugiani, O., Murrell, J.R., Giaccone, G., Hasegawa, M., Ghigo, G., Tabaton, M., Morbin, M., Primavera, A., Carella, F., Solaro, C., Grisoli, M., Savoiano, M., Spillantini, M.G., Tagliavini, F., Goedert, M. & Ghetti, B. (1999) Frontotemporal dementia and corticobasal degeneration in a family with a P301S mutation in tau. *J Neuropathol Exp Neurol*, **58**, 667-677.
- Bulenger, S., Marullo, S. & Bouvier, M. (2005) Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci*, **26**, 131-137.
- Bunker, J.M., Kamath, K., Wilson, L., Jordan, M.A. & Feinstein, S.C. (2006) FTDP-17 mutations compromise the ability of tau to regulate microtubule dynamics in cells. *J Biol Chem*, **281**, 11856-11863.
- Burstein, E.S., Ott, T.R., Feddock, M., Ma, J.N., Fuhs, S., Wong, S., Schiffer, H.H., Brann, M.R. & Nash, N.R. (2006) Characterization of the Mas-related gene family: structural and functional conservation of human and rhesus MrgX receptors. *Br J Pharmacol*, **147**, 73-82.
- Buzsáki, G. (1996) The hippocampo-neocortical dialogue. *Cereb Cortex*, **6**, 81-92.
- Caceres, A. & Kosik, K.S. (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature*, **343**, 461-463.
- Cammalleri, M., Cervia, D., Dal Monte, M., Martini, D., Langenegger, D., Fehlmann, D., Feuerbach, D., Pavan, B., Hoyer, D. & Bagnoli, P. (2006) Compensatory changes in the hippocampus of somatostatin knockout mice: upregulation of somatostatin receptor 2 and its function in the control of bursting activity and synaptic transmission. *Eur J Neurosci*, **23**, 2404-2422.
- Campion, D., Dumanchin, C., Hannequin, D., Dubois, B., Belliard, S., Puel, M., Thomas-Anterion, C., Michon, A., Martin, C., Charbonnier, F., Raux, G., Camuzat, A., Penet, C., Mesnage, V., Martinez, M., Clerget-Darpoux, F., Brice, A. & Frebourg, T. (1999) Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet*, **65**, 664-670.
- Castellano, C. & McGaugh, J.L. (1991) Oxotremorine attenuates retrograde amnesia induced by post-training administration of the GABAergic agonists muscimol and baclofen. *Behav Neural Biol*, **56**, 25-31.
- Cavanagh, M.E. & Parnavelas, J.G. (1988) Development of somatostatin immunoreactive neurons in the rat occipital cortex: a combined immunocytochemical-autoradiographic study. *J Comp Neurol*, **268**, 1-12.
- Cervia, D. & Bagnoli, P. (2007) An update on somatostatin receptor signaling in native systems and new insights on their pathophysiology. *Pharmacol Ther*, **116**, 322-341.

- Cescato, R., Schulz, S., Waser, B., Eltschinger, V., Rivier, J.E., Wester, H.J., Culler, M., Ginj, M., Liu, Q., Schonbrunn, A. & Reubi, J.C. (2006) Internalization of sst2, sst3, and sst5 receptors: effects of somatostatin agonists and antagonists. *J Nucl Med*, **47**, 502-511.
- Citron, M., Diehl, T.S., Gordon, G., Biere, A.L., Seubert, P. & Selkoe, D.J. (1996) Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13170-13175.
- Clark, C.M., Davatzikos, C., Borthakur, A., Newberg, A., Leight, S., Lee, V.M. & Trojanowski, J.Q. (2008) Biomarkers for early detection of Alzheimer pathology. *Neurosignals*, **16**, 11-18.
- Cleveland, D.W., Hwo, S.Y. & Kirschner, M.W. (1977) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol*, **116**, 207-225.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L. & Pericak-Vance, M.A. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, **261**, 921-923.
- Correas, I., Diaz-Nido, J. & Avila, J. (1992) Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain. *J Biol Chem*, **267**, 15721-15728.
- Couchie, D., Mavilia, C., Georgieff, I.S., Liem, R.K., Shelanski, M.L. & Nunez, J. (1992) Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 4378-4381.
- Coyle, J.T., Price, D.L. & DeLong, M.R. (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, **219**, 1184-1190.
- Cras, P., Smith, M.A., Richey, P.L., Siedlak, S.L., Mulvihill, P. & Perry, G. (1995) Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*, **89**, 291-295.
- Criado, J.R., Li, H., Jiang, X., Spina, M., Huitron-Resendiz, S., Liapakis, G., Calbet, M., Siehler, S., Henriksen, S.J., Koob, G., Hoyer, D., Sutcliffe, J.G., Goodman, M. & de Lecea, L. (1999) Structural and compositional determinants of cortistatin activity. *J Neurosci Res*, **56**, 611-619.
- Cristiani, R., Fontanesi, G., Casini, G., Petrucci, C., Viollet, C. & Bagnoli, P. (2000) Expression of somatostatin subtype 1 receptor in the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **41**, 3191-3199.
- Csaba, Z. & Dournaud, P. (2001) Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides*, **35**, 1-23.
- Cummings, J.L. (2004) Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, **351**, 56-67.
- Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N.J. & Hirokawa, N. (1992) Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature*, **360**, 674-677.

- Chin, S.S. & Goldman, J.E. (1996) Glial inclusions in CNS degenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*, **55**, 499-508.
- Cho, J.H. & Johnson, G.V. (2003) Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J Biol Chem*, **278**, 187-193.
- Chrobak, J.J., Stackman, R.W. & Walsh, T.J. (1989) Intraseptal administration of muscimol produces dose-dependent memory impairments in the rat. *Behav Neural Biol*, **52**, 357-369.
- D'Souza, I. & Schellenberg, G.D. (2000) Determinants of 4-repeat tau expression. Coordination between enhancing and inhibitory splicing sequences for exon 10 inclusion. *J Biol Chem*, **275**, 17700-17709.
- D'Souza, I. & Schellenberg, G.D. (2002) tau Exon 10 expression involves a bipartite intron 10 regulatory sequence and weak 5' and 3' splice sites. *J Biol Chem*, **277**, 26587-26599.
- Dalm, V.A., Van Hagen, P.M., de Krijger, R.R., Kros, J.M., Van Koetsveld, P.M., Van Der Lely, A.J., Lamberts, S.W. & Hofland, L.J. (2004) Distribution pattern of somatostatin and cortistatin mRNA in human central and peripheral tissues. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **60**, 625-629.
- Dalm, V.A., van Hagen, P.M., van Koetsveld, P.M., Langerak, A.W., van der Lely, A.J., Lamberts, S.W. & Hofland, L.J. (2003) Cortistatin rather than somatostatin as a potential endogenous ligand for somatostatin receptors in the human immune system. *J Clin Endocrinol Metab*, **88**, 270-276.
- Damasio, A.R. (1989) Time-locked multiregional retroactivation: a systems-level proposal for the neural substrates of recall and recognition. *Cognition*, **33**, 25-62.
- Danguir, J. (1986) Intracerebroventricular infusion of somatostatin selectively increases paradoxical sleep in rats. *Brain Res*, **367**, 26-30.
- Danzer, K.M., Haasen, D., Karow, A.R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretschmar, H., Hengerer, B. & Kostka, M. (2007) Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J Neurosci*, **27**, 9220-9232.
- Davies, P., Katzman, R. & Terry, R.D. (1980) Reduced somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer's disease and Alzheimer senile dementia. *Nature*, **288**, 279-280.
- Davies, P. & Maloney, A.J. (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*, **2**, 1403.
- Dawson, H.N., Ferreira, A., Eyster, M.V., Ghoshal, N., Binder, L.I. & Vitek, M.P. (2001) Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci*, **114**, 1179-1187.
- de Lecea, L. (2007) Cortistatin-functions in the Central Nervous System. *Molecular and Cellular Endocrinology*.

- de Lecea, L. & Castano, J.P. (2006) Cortistatin: not just another somatostatin analog. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, **2**, 356-357.
- de Lecea, L., Criado, J.R., Prospero-Garcia, O., Gautvik, K.M., Schweitzer, P., Danielson, P.E., Dunlop, C.L., Siggins, G.R., Henriksen, S.J. & Sutcliffe, J.G. (1996) A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature*, **381**, 242-245.
- de Lecea, L., del Rio, J.A., Criado, J.R., Alcantara, S., Morales, M., Danielson, P.E., Henriksen, S.J., Soriano, E. & Sutcliffe, J.G. (1997a) Cortistatin is expressed in a distinct subset of cortical interneurons. *J Neurosci*, **17**, 5868-5880.
- de Lecea, L., Ruiz-Lozano, P., Danielson, P.E., Peelle-Kirley, J., Foye, P.E., Frankel, W.N. & Sutcliffe, J.G. (1997b) Cloning, mRNA expression, and chromosomal mapping of mouse and human preprocortistatin. *Genomics*, **42**, 499-506.
- De Strooper, B. & Woodgett, J. (2003) Alzheimer's disease: Mental plaque removal. *Nature*, **423**, 392-393.
- Deghenghi, R., Papotti, M., Ghigo, E. & Muccioli, G. (2001) Cortistatin, but not somatostatin, binds to growth hormone secretagogue (GHS) receptors of human pituitary gland. *J Endocrinol Invest*, **24**, RC1-3.
- Delacourte, A., David, J.P., Sergeant, N., Buee, L., Wattez, A., Vermersch, P., Ghazali, F., Fallet-Bianco, C., Pasquier, F., Lebert, F., Petit, H. & Di Menza, C. (1999) The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*, **52**, 1158-1165.
- Delisle, M.B., Murrell, J.R., Richardson, R., Trofatter, J.A., Rascol, O., Soulagés, X., Mohr, M., Calvas, P. & Ghetti, B. (1999) A mutation at codon 279 (N279K) in exon 10 of the Tau gene causes a tauopathy with dementia and supranuclear palsy. *Acta Neuropathol*, **98**, 62-77.
- Demuro, A., Mina, E., Kaye, R., Milton, S.C., Parker, I. & Glabe, C.G. (2005) Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem*, **280**, 17294-17300.
- Díaz-Hernández, M., Gómez-Villafuertes, R., Hernando, F., Pintor, J. & Miras-Portugal, M.T. (2001a) Presence of different ATP receptors on rat midbrain single synaptic terminals. Involvement of the P2X(3) subunits. *Neurosci Lett*, **301**, 159-162.
- Díaz-Hernández, M., Pintor, J., Castro, E. & Miras-Portugal, M.T. (2001b) Independent receptors for diadenosine pentaphosphate and ATP in rat midbrain single synaptic terminals. *Eur J Neurosci*, **14**, 918-926.
- Díaz-Nido, J., Serrano, L., López-Otin, C., Vandekerckhove, J. & Avila, J. (1990) Phosphorylation of a neuronal-specific beta-tubulin isotype. *J Biol Chem*, **265**, 13949-13954.
- Ding, H., Dolan, P.J. & Johnson, G.V. (2008) Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *J Neurochem*, **106**, 2119-2130.
- Dolorfo, C.L. & Amaral, D.G. (1998) Entorhinal cortex of the rat: organization of intrinsic connections. *J Comp Neurol*, **398**, 49-82.

- Dotti, C.G. & Banker, G.A. (1987) Experimentally induced alteration in the polarity of developing neurons. *Nature*, **330**, 254-256.
- Doty, R.L. (2008) The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? *Ann Neurol*, **63**, 7-15.
- Dournaud, P., Boudin, H., Schonbrunn, A., Tannenbaum, G.S. & Beaudet, A. (1998) Interrelationships between somatostatin sst2A receptors and somatostatin-containing axons in rat brain: evidence for regulation of cell surface receptors by endogenous somatostatin. *J Neurosci*, **18**, 1056-1071.
- Dournaud, P., Gu, Y.Z., Schonbrunn, A., Mazella, J., Tannenbaum, G.S. & Beaudet, A. (1996) Localization of the somatostatin receptor SST2A in rat brain using a specific anti-peptide antibody. *J Neurosci*, **16**, 4468-4478.
- Dreses-Werringloer, U., Lambert, J.C., Vingtdeux, V., Zhao, H., Vais, H., Siebert, A., Jain, A., Koppel, J., Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Pasquier, F., Galimberti, D., Scarpini, E., Mann, D., Lendon, C., Campion, D., Amouyel, P., Davies, P., Fosskett, J.K., Campagne, F. & Marambaud, P. (2008) A polymorphism in CALHM1 influences Ca<sup>2+</sup> homeostasis, Aβ levels, and Alzheimer's disease risk. *Cell*, **133**, 1149-1161.
- Drewes, G., Ebner, A., Preuss, U., Mandelkow, E.M. & Mandelkow, E. (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell*, **89**, 297-308.
- Drewes, G., Lichtenberg-Kraag, B., Doring, F., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Goris, J., Doree, M. & Mandelkow, E. (1992) Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *Embo J*, **11**, 2131-2138.
- Drewes, G., Trinczek, B., Illenberger, S., Biernat, J., Schmitt-Ulms, G., Meyer, H.E., Mandelkow, E.M. & Mandelkow, E. (1995) Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J Biol Chem*, **270**, 7679-7688.
- Drubin, D.G., Feinstein, S.C., Shooter, E.M. & Kirschner, M.W. (1985) Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *J Cell Biol*, **101**, 1799-1807.
- Drubin, D.G. & Kirschner, M.W. (1986) Tau protein function in living cells. *J Cell Biol*, **103**, 2739-2746.
- Duff, K. & Planel, E. (2005) Untangling memory deficits. *Nat Med*, **11**, 826-827.
- Duran-Prado, M., Bucharles, C., Gonzalez, B.J., Vazquez-Martinez, R., Martinez-Fuentes, A.J., Garcia-Navarro, S., Rhodes, S.J., Vaudry, H., Malagon, M.M. & Castano, J.P. (2007) Porcine somatostatin receptor 2 displays typical pharmacological sst2 features but unique dynamics of homodimerization and internalization. *Endocrinology*, **148**, 411-421.
- Ebner, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B. & Mandelkow, E. (1998) Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles,

- mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol*, **143**, 777-794.
- Ejeskar, K., Abel, F., Sjöberg, R., Backström, J., Kogner, P. & Martinsson, T. (2000) Fine mapping of the human preprocortistatin gene (CORT) to neuroblastoma consensus deletion region 1p36.3-->p36.2, but absence of mutations in primary tumors. *Cytogenet Cell Genet*, **89**, 62-66.
- Engel, T., Hernandez, F., Avila, J. & Lucas, J.J. (2006a) Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3. *J Neurosci*, **26**, 5083-5090.
- Engel, T., Lucas, J.J., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A., Avila, J. & Hernandez, F. (2006b) Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3 $\beta$  in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol Aging*, **27**, 1258-1268.
- Ennaceur, A., Neave, N. & Aggleton, J.P. (1997) Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp Brain Res*, **113**, 509-519.
- Epelbaum, J., Dournaud, P., Fodor, M. & Viollet, C. (1994) The neurobiology of somatostatin. *Crit Rev Neurobiol*, **8**, 25-44.
- Esclapez, M. & Houser, C.R. (1995) Somatostatin neurons are a subpopulation of GABA neurons in the rat dentate gyrus: evidence from colocalization of pre-prosomatostatin and glutamate decarboxylase messenger RNAs. *Neuroscience*, **64**, 339-355.
- Evans, D.A., Hebert, L.E., Beckett, L.A., Scherr, P.A., Albert, M.S., Chown, M.J., Pilgrim, D.M. & Taylor, J.O. (1997) Education and other measures of socioeconomic status and risk of incident Alzheimer disease in a defined population of older persons. *Arch Neurol*, **54**, 1399-1405.
- Feindt, J., Becker, I., Blomer, U., Hugo, H.H., Mehdorn, H.M., Krisch, B. & Mentlein, R. (1995) Expression of somatostatin receptor subtypes in cultured astrocytes and gliomas. *J Neurochem*, **65**, 1997-2005.
- Fellous, A., Francon, J., Lennon, A.M. & Nunez, J. (1977) Microtubule assembly in vitro. Purification of assembly-promoting factors. *Eur J Biochem*, **78**, 167-174.
- Ferone, D., Pivonello, R., Lastoria, S., Faggiano, A., Del Basso de Caro, M.L., Cappabianca, P., Lombardi, G. & Colao, A. (2001) In vivo and in vitro effects of octreotide, quinagolide and cabergoline in four hyperprolactinaemic acromegalics: correlation with somatostatin and dopamine D2 receptor scintigraphy. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **54**, 469-477.
- Ferrari, A., Hoernndli, F., Baechli, T., Nitsch, R.M. & Gotz, J. (2003) beta-Amyloid induces paired helical filament-like tau filaments in tissue culture. *J Biol Chem*, **278**, 40162-40168.
- Ferreira, A., Busciglio, J. & Cáceres, A. (1989) Microtubule formation and neurite growth in cerebellar macroneurons which develop in vitro: evidence for the involvement of the microtubule-associated proteins, MAP-1a, HMW-MAP2 and Tau. *Brain Res Dev Brain Res*, **49**, 215-228.



- Ferrer, I., Barrachina, M. & Puig, B. (2002) Anti-tau phospho-specific Ser262 antibody recognizes a variety of abnormal hyper-phosphorylated tau deposits in tauopathies including Pick bodies and argyrophilic grains. *Acta Neuropathol*, **104**, 658-664.
- Ferrer, I., Blanco, R., Carmona, M. & Puig, B. (2001) Phosphorylated mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK-P), protein kinase of 38 kDa (p38-P), stress-activated protein kinase (SAPK/JNK-P), and calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaM kinase II) are differentially expressed in tau deposits in neurons and glial cells in tauopathies. *J Neural Transm*, **108**, 1397-1415.
- Flood, J.F., Uezu, K. & Morley, J.E. (1997) The cortical neuropeptide, cortistatin-14, impairs post-training memory processing. *Brain Res*, **775**, 250-252.
- Forloni, G., Chiesa, R., Smiroldo, S., Verga, L., Salmona, M., Tagliavini, F. & Angeretti, N. (1993) Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of beta amyloid fragment 25-35. *Neuroreport*, **4**, 523-526.
- Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M. & Wilcock, G.K. (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **66**, 137-147.
- Frankland, P.W. & Bontempi, B. (2005) The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 119-130.
- Frappier, T.F., Georgieff, I.S., Brown, K. & Shelanski, M.L. (1994) tau Regulation of microtubule-microtubule spacing and bundling. *J Neurochem*, **63**, 2288-2294.
- Fritz, N., Macrez, N., Mironneau, J., Jeyakumar, L.H., Fleischer, S. & Morel, J.L. (2005) Ryanodine receptor subtype 2 encodes Ca<sup>2+</sup> oscillations activated by acetylcholine via the M2 muscarinic receptor/cADP-ribose signalling pathway in duodenum myocytes. *J Cell Sci*, **118**, 2261-2270.
- Fukusumi, S., Kitada, C., Takekawa, S., Kizawa, H., Sakamoto, J., Miyamoto, M., Hinuma, S., Kitano, K. & Fujino, M. (1997) Identification and characterization of a novel human cortistatin-like peptide. *Biochem Biophys Res Commun*, **232**, 157-163.
- Fukutani, Y., Kobayashi, K., Nakamura, I., Watanabe, K., Isaki, K. & Cairns, N.J. (1995) Neurons, intracellular and extracellular neurofibrillary tangles in subdivisions of the hippocampal cortex in normal ageing and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, **200**, 57-60.
- Gais, S., Albouy, G., Boly, M., Dang-Vu, T.T., Darsaud, A., Desseilles, M., Rauchs, G., Schabus, M., Sterpenich, V., Vandewalle, G., Maquet, P. & Peigneux, P. (2007) Sleep transforms the cerebral trace of declarative memories. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 18778-18783.
- Gais, S. & Born, J. (2004a) Declarative memory consolidation: mechanisms acting during human sleep. *Learn Mem*, **11**, 679-685.
- Gais, S. & Born, J. (2004b) Low acetylcholine during slow-wave sleep is critical for declarative memory consolidation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2140-2144.
- Galanopoulou, A.S., Kent, G., Rabbani, S.N., Seidah, N.G. & Patel, Y.C. (1993) Heterologous processing of prosomatostatin in constitutive and regulated secretory pathways. Putative role of the endoproteases furin, PC1, and PC2. *J Biol Chem*, **268**, 6041-6049.

- Galvan, M., David, J.P., Delacourte, A., Luna, J. & Mena, R. (2001) Sequence of neurofibrillary changes in aging and Alzheimer's disease: A confocal study with phospho-tau antibody, AD2. *J Alzheimers Dis*, **3**, 417-425.
- Galloway, P.G., Perry, G. & Gambetti, P. (1987) Hirano body filaments contain actin and actin-associated proteins. *J Neuropathol Exp Neurol*, **46**, 185-199.
- Gamblin, T.C., Berry, R.W. & Binder, L.I. (2003) Modeling tau polymerization in vitro: a review and synthesis. *Biochemistry*, **42**, 15009-15017.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F. & et al. (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*, **373**, 523-527.
- Gao, Y.S., Hubbert, C.C., Lu, J., Lee, Y.S., Lee, J.Y. & Yao, T.P. (2007) Histone deacetylase 6 regulates growth factor-induced actin remodeling and endocytosis. *Mol Cell Biol*, **27**, 8637-8647.
- Garver, T.D., Harris, K.A., Lehman, R.A., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. & Billingsley, M.L. (1994) Tau phosphorylation in human, primate, and rat brain: evidence that a pool of tau is highly phosphorylated in vivo and is rapidly dephosphorylated in vitro. *J Neurochem*, **63**, 2279-2287.
- Georgieff, I.S., Liem, R.K., Mellado, W., Nunez, J. & Shelanski, M.L. (1991) High molecular weight tau: preferential localization in the peripheral nervous system. *J Cell Sci*, **100** ( Pt 1), 55-60.
- Geula, C. (1998) Abnormalities of neural circuitry in Alzheimer's disease: hippocampus and cortical cholinergic innervation. *Neurology*, **51**, S18-29; discussion S65-17.
- Geula, C. & Mesulam, M.M. (1996) Systematic regional variations in the loss of cortical cholinergic fibers in Alzheimer's disease. *Cereb Cortex*, **6**, 165-177.
- Gibson, P.H. & Tomlinson, B.E. (1977) Numbers of Hirano bodies in the hippocampus of normal and demented people with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*, **33**, 199-206.
- Glatz, D.C., Rujescu, D., Tang, Y., Berendt, F.J., Hartmann, A.M., Faltraco, F., Rosenberg, C., Hulette, C., Jellinger, K., Hampel, H., Riederer, P., Moller, H.J., Andreadis, A., Henkel, K. and Stamm, S. (2006) The alternative splicing of tau exon 10 and its regulatory proteins CLK2 and TRA2-BETA1 changes in sporadic Alzheimer's disease. *J Neurochem*, Vol. 96, pp. 635-644.
- Glenner, G.G. & Wong, C.W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **120**, 885-890.
- Gluzman, Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, **23**, 175-182.

- Gnagey, A.L., Seidenberg, M. & Ellis, J. (1999) Site-directed mutagenesis reveals two epitopes involved in the subtype selectivity of the allosteric interactions of gallamine at muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*, **56**, 1245-1253.
- Gnanapavan, S., Kola, B., Bustin, S.A., Morris, D.G., McGee, P., Fairclough, P., Bhattacharya, S., Carpenter, R., Grossman, A.B. & Korbonits, M. (2002) The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 2988.
- Goedert, M. (2005) Tau gene mutations and their effects. *Mov Disord*, **20 Suppl 12**, S45-52.
- Goedert, M., Hasegawa, M., Jakes, R., Lawler, S., Cuenda, A. & Cohen, P. (1997) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett*, **409**, 57-62.
- Goedert, M. & Jakes, R. (1990) Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *Embo J*, **9**, 4225-4230.
- Goedert, M., Jakes, R., Qi, Z., Wang, J.H. & Cohen, P. (1995) Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates tau protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Neurochem*, **65**, 2804-2807.
- Goedert, M. & Spillantini, M.G. (2000) Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, **1502**, 110-121.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D. & Crowther, R.A. (1989a) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, **3**, 519-526.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J. & Crowther, R.A. (1989b) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *Embo J*, **8**, 393-399.
- Gomez-Ramos, A., Diaz-Hernandez, M., Cuadros, R., Hernandez, F. & Avila, J. (2006) Extracellular tau is toxic to neuronal cells. *FEBS Lett*, **580**, 4842-4850.
- Gomez-Ramos, A., Diaz-Nido, J., Smith, M.A., Perry, G. & Avila, J. (2003) Effect of the lipid peroxidation product acrolein on tau phosphorylation in neural cells. *J Neurosci Res*, **71**, 863-870.
- Gong, C.X., Liu, F., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (2005) Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, **112**, 813-838.
- Goode, B.L., Denis, P.E., Panda, D., Radeke, M.J., Miller, H.P., Wilson, L. & Feinstein, S.C. (1997) Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol Biol Cell*, **8**, 353-365.
- Gotz, J., Chen, F., van Dorpe, J. & Nitsch, R.M. (2001) Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science*, **293**, 1491-1495.
- Grant, M., Collier, B. & Kumar, U. (2004a) Agonist-dependent dissociation of human somatostatin receptor 2 dimers: a role in receptor trafficking. *J Biol Chem*, **279**, 36179-36183.

- Grant, M., Patel, R.C. & Kumar, U. (2004b) The role of subtype-specific ligand binding and the C-tail domain in dimer formation of human somatostatin receptors. *J Biol Chem*, **279**, 38636-38643.
- Greenberg, S.G. & Davies, P. (1990) A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5827-5831.
- Greenberg, S.G., Davies, P., Schein, J.D. & Binder, L.I. (1992) Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. *J Biol Chem*, **267**, 564-569.
- Greenwood, I.A., Helliwell, R.M. & Large, W.A. (1997) Modulation of Ca(2+)-activated Cl<sup>-</sup> currents in rabbit portal vein smooth muscle by an inhibitor of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake. *J Physiol*, **505 ( Pt 1)**, 53-64.
- Greenwood, J.A., Scott, C.W., Spreen, R.C., Caputo, C.B. & Johnson, G.V. (1994) Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert. Identification of threonine 39 as the primary phosphate acceptor. *J Biol Chem*, **269**, 4373-4380.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M. & Binder, L.I. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 4913-4917.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, **260**, 3440-3450.
- Hajilou, B.B. & Done, D.J. (2007) Evidence for a dissociation of structural and semantic knowledge in dementia of the Alzheimer type (DAT). *Neuropsychologia*, **45**, 810-816.
- Handel, M., Schulz, S., Stanarius, A., Schreff, M., Erdtmann-Vourliotis, M., Schmidt, H., Wolf, G. & Holtt, V. (1999) Selective targeting of somatostatin receptor 3 to neuronal cilia. *Neuroscience*, **89**, 909-926.
- Hanger, D.P., Betts, J.C., Loviny, T.L., Blackstock, W.P. & Anderton, B.H. (1998) New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer's disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry. *J Neurochem*, **71**, 2465-2476.
- Hanger, D.P., Byers, H.L., Wray, S., Leung, K.Y., Saxton, M.J., Seereeram, A., Reynolds, C.H., Ward, M.A. & Anderton, B.H. (2007) Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J Biol Chem*, **282**, 23645-23654.
- Hanger, D.P., Hughes, K., Woodgett, J.R., Brion, J.P. & Anderton, B.H. (1992) Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett*, **147**, 58-62.

- Hansson, O., Zetterberg, H., Buchhave, P., Londos, E., Blennow, K. & Minthon, L. (2006) Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol*, **5**, 228-234.
- Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T. & Hirokawa, N. (1994) Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature*, **369**, 488-491.
- Hardy, J. (2002) Testing times for the "amyloid cascade hypothesis". *Neurobiol Aging*, **23**, 1073-1074.
- Hardy, J.A., Mann, D.M., Wester, P. & Winblad, B. (1986) An integrative hypothesis concerning the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **7**, 489-502.
- Hartmann, T., Kuchenbecker, J. & Grimm, M.O. (2007) Alzheimer's disease: the lipid connection. *J Neurochem*, **103 Suppl 1**, 159-170.
- Hasegawa, M., Morishima-Kawashima, M., Takio, K., Suzuki, M., Titani, K. & Ihara, Y. (1992) Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem*, **267**, 17047-17054.
- Hasselmo, M.E. (1999) Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends Cogn Sci*, **3**, 351-359.
- Hayashi, M., Yamashita, A. & Shimizu, K. (1997) Somatostatin and brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in the primate brain: decreased levels of mRNAs during aging. *Brain Res*, **749**, 283-289.
- Heidet, V., Faivre-Bauman, A., Kordon, C., Loudes, C., Rasolonjanahary, S. & Epelbaum, J. (1990) Functional maturation of somatostatin neurons and somatostatin receptors during development of mouse hypothalamus in vivo and in vitro. *Brain Res Dev Brain Res*, **57**, 85-92.
- Helboe, L., Hay-Schmidt, A., Stidsen, C.E. & Moller, M. (1999) Immunohistochemical localization of the somatostatin receptor subtype 2 (sst2) in the central nervous system of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Comp Neurol*, **405**, 247-261.
- Helboe, L., Stidsen, C.E. & Moller, M. (1998) Immunohistochemical and cytochemical localization of the somatostatin receptor subtype sst1 in the somatostatinergic parvocellular neuronal system of the rat hypothalamus. *J Neurosci*, **18**, 4938-4945.
- Hellstrom-Lindahl, E. (2000) Modulation of beta-amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation by acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol*, **393**, 255-263.
- Hernandez, F., Perez, M., Lucas, J.J. & Avila, J. (2002) Sulfo-glycosaminoglycan content affects PHF-tau solubility and allows the identification of different types of PHFs. *Brain Res*, **935**, 65-72.
- Hernandez, F., Perez, M., Lucas, J.J., Mata, A.M., Bhat, R. & Avila, J. (2004) Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. Implications for Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, **279**, 3801-3806.

- Hervieu, G. & Emson, P.C. (1998) The localization of somatostatin receptor 1 (sst1) immunoreactivity in the rat brain using an N-terminal specific antibody. *Neuroscience*, **85**, 1263-1284.
- Heutink, P. (2000) Untangling tau-related dementia. *Hum Mol Genet*, **9**, 979-986.
- Hipkin, R.W., Friedman, J., Clark, R.B., Eppler, C.M. & Schonbrunn, A. (1997) Agonist-induced desensitization, internalization, and phosphorylation of the sst2A somatostatin receptor. *J Biol Chem*, **272**, 13869-13876.
- Hirano, A. (1994) Hirano bodies and related neuronal inclusions. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **20**, 3-11.
- Hirokawa, N., Shiomura, Y. & Okabe, S. (1988) Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol*, **107**, 1449-1459.
- Hofland, L.J. & Lamberts, S.W. (2003) The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance. *Endocr Rev*, **24**, 28-47.
- Holdstock, J.S. (2005) The role of the human medial temporal lobe in object recognition and object discrimination. *Q J Exp Psychol B*, **58**, 326-339.
- Holtzman, D.M., Bales, K.R., Tenkova, T., Fagan, A.M., Parsadanian, M., Sartorius, L.J., Mackey, B., Olney, J., McKeel, D., Wozniak, D. and Paul, S.M. (2000) Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2892-2897.
- Hong, M., Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Wszolek, Z., Reed, L., Miller, B.I., Geschwind, D.H., Bird, T.D., McKeel, D., Goate, A., Morris, J.C., Wilhelmsen, K.C., Schellenberg, G.D., Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M. (1998) Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science*, **282**, 1914-1917.
- Hosli, E. & Hosli, L. (1994) Colocalization of binding sites for somatostatin, muscarine and nicotine on cultured neurones of rat neocortex, cerebellum, brain stem and spinal cord: combined autoradiographic and immunohistochemical studies. *Neurosci Lett*, **173**, 71-74.
- Hosoi, T., Uchiyama, M., Okumura, E., Saito, T., Ishiguro, K., Uchida, T., Okuyama, A., Kishimoto, T. & Hisanaga, S. (1995) Evidence for cdk5 as a major activity phosphorylating tau protein in porcine brain extract. *J Biochem*, **117**, 741-749.
- Hoyer, D., Bell, G.I., Berelowitz, M., Epelbaum, J., Feniuk, W., Humphrey, P.P., O'Carroll, A.M., Patel, Y.C., Schonbrunn, A., Taylor, J.E. & et al. (1995) Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **16**, 86-88.
- Hua, Q. & He, R.Q. (2002) Effect of phosphorylation and aggregation on tau binding to DNA. *Protein Pept Lett*, **9**, 349-357.
- Hua, Q., He, R.Q., Haque, N., Qu, M.H., del Carmen Alonso, A., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (2003) Microtubule associated protein tau binds to double-stranded but not single-stranded DNA. *Cell Mol Life Sci*, **60**, 413-421.

- Hukovic, N., Panetta, R., Kumar, U. & Patel, Y.C. (1996) Agonist-dependent regulation of cloned human somatostatin receptor types 1-5 (hSSTR1-5): subtype selective internalization or upregulation. *Endocrinology*, **137**, 4046-4049.
- Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R.C., Stevens, M., de Graaff, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J.M., Nowotny, P., Che, L.K., Norton, J., Morris, J.C., Reed, L.A., Trojanowski, J., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahn, S., Dark, F., Tannenberg, T., Dodd, P.R., Hayward, N., Kwok, J.B., Schofield, P.R., Andreadis, A., Snowden, J., Craufurd, D., Neary, D., Owen, F., Oostra, B.A., Hardy, J., Goate, A., van Swieten, J., Mann, D., Lynch, T. & Heutink, P. (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*, **393**, 702-705.
- Ikegami, S., Harada, A. & Hirokawa, N. (2000) Muscle weakness, hyperactivity, and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice. *Neurosci Lett*, **279**, 129-132.
- Iqbal, K., Flory, M., Khatoon, S., Soininen, H., Pirttilä, T., Lehtovirta, M., Alafuzoff, I., Blennow, K., Andreasen, N., Vanmechelen, E. & Grundke-Iqbal, I. (2005) Subgroups of Alzheimer's disease based on cerebrospinal fluid molecular markers. *Ann Neurol*, **58**, 748-757.
- Ishiguro, K., Omori, A., Takamatsu, M., Sato, K., Arioka, M., Uchida, T. & Imahori, K. (1992) Phosphorylation sites on tau by tau protein kinase I, a bovine derived kinase generating an epitope of paired helical filaments. *Neurosci Lett*, **148**, 202-206.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Shirotani, K., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Hama, E., Lee, H.J. & Saido, T.C. (2001) Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science*, **292**, 1550-1552.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H.J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y. & Saido, T.C. (2000) Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med*, **6**, 143-150.
- Izquierdo-Claros, R.M., Boyano-Adanez, M.C., Larsson, C., Gustavsson, L. & Arilla, E. (1997) Acute effects of D1- and D2-receptor agonist and antagonist drugs on somatostatin binding, inhibition of adenylyl cyclase activity and accumulation of inositol 1,4,5-trisphosphate in the rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res*, **47**, 99-107.
- Jenkins, S.M. & Johnson, G.V. (1998) Tau complexes with phospholipase C-gamma in situ. *Neuroreport*, **9**, 67-71.
- Jicha, G.A., Parisi, J.E., Dickson, D.W., Cha, R.H., Johnson, K.A., Smith, G.E., Boeve, B.F., Petersen, R.C. & Knopman, D.S. (2008) Age and apoE associations with complex pathologic features in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*, **273**, 34-39.
- Jorm, A.F. & Jolley, D. (1998) The incidence of dementia: a meta-analysis. *Neurology*, **51**, 728-733.
- Kamohara, M., Matsuo, A., Takasaki, J., Kohda, M., Matsumoto, M., Matsumoto, S., Soga, T., Hiyama, H., Kabori, M. & Katou, M. (2005) Identification of MrgX2 as a human G-

- protein-coupled receptor for proadrenomedullin N-terminal peptides. *Biochem Biophys Res Commun*, **330**, 1146-1152.
- Kampers, T., Friedhoff, P., Biernat, J., Mandelkow, E.M. & Mandelkow, E. (1996) RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Lett*, **399**, 344-349.
- Kanemitsu, H., Tomiyama, T. & Mori, H. (2003) Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neurosci Lett*, **350**, 113-116.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K. & Muller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, **325**, 733-736.
- Kar, S., Fan, J., Smith, M.J., Goedert, M. & Amos, L.A. (2003) Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *Embo J*, **22**, 70-77.
- Kar, S., Slowikowski, S.P., Westaway, D. & Mount, H.T. (2004) Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci*, **29**, 427-441.
- Kawaguchi, Y., Kovacs, J.J., McLaurin, A., Vance, J.M., Ito, A. & Yao, T.P. (2003) The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*, **115**, 727-738.
- Kawas, C.H. & Corrada, M.M. (2006) Alzheimer's and dementia in the oldest-old: a century of challenges. *Curr Alzheimer Res*, **3**, 411-419.
- Khatoon, S., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (1994) Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains. *FEBS Lett*, **351**, 80-84.
- King, M.E., Ahuja, V., Binder, L.I. & Kuret, J. (1999) Ligand-dependent tau filament formation: implications for Alzheimer's disease progression. *Biochemistry*, **38**, 14851-14859.
- Kins, S., Kurosinski, P., Nitsch, R.M. & Gotz, J. (2003) Activation of the ERK and JNK signaling pathways caused by neuron-specific inhibition of PP2A in transgenic mice. *Am J Pathol*, **163**, 833-843.
- Knops, J., Kosik, K.S., Lee, G., Pardee, J.D., Cohen-Gould, L. & McConlogue, L. (1991) Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J Cell Biol*, **114**, 725-733.
- Knowles, R., LeClerc, N. & Kosik, K.S. (1994) Organization of actin and microtubules during process formation in tau-expressing Sf9 cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **28**, 256-264.
- Koenig, J.A. & Edwardson, J.M. (1997) Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **18**, 276-287.
- Kosaka, T., Wu, J.Y. & Benoit, R. (1988) GABAergic neurons containing somatostatin-like immunoreactivity in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Exp Brain Res*, **71**, 388-398.



- Kosik, K.S., Crandall, J.E., Mufson, E.J. & Neve, R.L. (1989) Tau in situ hybridization in normal and Alzheimer brain: localization in the somatodendritic compartment. *Ann Neurol*, **26**, 352-361.
- Kreienkamp, H.J. (1999) Molecular biology of the receptors for somatostatin and cortistatin. *Results Probl Cell Differ*, **26**, 215-237.
- Kukull, W.A. & Bowen, J.D. (2002) Dementia epidemiology. *Med Clin North Am*, **86**, 573-590.
- Kumar, P., Wu, H., McBride, J.L., Jung, K.E., Kim, M.H., Davidson, B.L., Lee, S.K., Shankar, P. & Manjunath, N. (2007) Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature*, **448**, 39-43.
- Kumar, U. (2005) Expression of somatostatin receptor subtypes (SSTR1-5) in Alzheimer's disease brain: an immunohistochemical analysis. *Neuroscience*, **134**, 525-538.
- Kurt, M.A., Davies, D.C. & Kidd, M. (1997) Paired helical filament morphology varies with intracellular location in Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett*, **239**, 41-44.
- Kwon, S., Zhang, Y. & Matthias, P. (2007) The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes Dev*, **21**, 3381-3394.
- Laatu, S., Revonsuo, A., Jaykka, H., Portin, R. & Rinne, J.O. (2003) Visual object recognition in early Alzheimer's disease: deficits in semantic processing. *Acta Neurol Scand*, **108**, 82-89.
- Ladner, C.J. & Lee, J.M. (1998) Pharmacological drug treatment of Alzheimer disease: the cholinergic hypothesis revisited. *J Neuropathol Exp Neurol*, **57**, 719-731.
- Lanzafame, A.A., Christopoulos, A. & Mitchelson, F. (2003) Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. *Receptors Channels*, **9**, 241-260.
- Lauckner, J., Frey, P. & Geula, C. (2003) Comparative distribution of tau phosphorylated at Ser262 in pre-tangles and tangles. *Neurobiol Aging*, **24**, 767-776.
- Laudon, H., Hansson, E.M., Melen, K., Bergman, A., Farmery, M.R., Winblad, B., Lendahl, U., von Heijne, G. & Naslund, J. (2005) A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J Biol Chem*, **280**, 35352-35360.
- Lee, A.C., Rahman, S., Hodges, J.R., Sahakian, B.J. & Graham, K.S. (2003) Associative and recognition memory for novel objects in dementia: implications for diagnosis. *Eur J Neurosci*, **18**, 1660-1670.
- Lee, G. (2005) Tau and src family tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta*, **1739**, 323-330.
- Lee, G., Cowan, N. & Kirschner, M. (1988) The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science*, **239**, 285-288.
- Lee, G., Neve, R.L. & Kosik, K.S. (1989) The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron*, **2**, 1615-1624.
- Lee, G., Newman, S.T., Gard, D.L., Band, H. & Panchamoorthy, G. (1998) Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci*, **111** ( Pt 21), 3167-3177.

- Lee, H.G., Perry, G., Moreira, P.I., Garrett, M.R., Liu, Q., Zhu, X., Takeda, A., Nunomura, A. & Smith, M.A. (2005) Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends Mol Med*, **11**, 164-169.
- Li, W., Wang, X.S., Qu, M.H., Liu, Y. & He, R.Q. (2005) Human protein tau represses DNA replication in vitro. *Biochim Biophys Acta*, **1726**, 280-286.
- Lindwall, G. & Cole, R.D. (1984) Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem*, **259**, 5301-5305.
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. & Gong, C.X. (2005a) Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci*, **22**, 1942-1950.
- Liu, F., Li, B., Tung, E.J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. & Gong, C.X. (2007) Site-specific effects of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation. *Eur J Neurosci*, **26**, 3429-3436.
- Liu, Q., Cescato, R., Dewi, D.A., Rivier, J., Reubi, J.C. & Schonbrunn, A. (2005b) Receptor signaling and endocytosis are differentially regulated by somatostatin analogs. *Mol Pharmacol*, **68**, 90-101.
- Liu, Q., Reubi, J.C., Wang, Y., Knoll, B.J. & Schonbrunn, A. (2003) In vivo phosphorylation of the somatostatin 2A receptor in human tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, **88**, 6073-6079.
- Loring, J.F., Wen, X., Lee, J.M., Seilhamer, J. & Somogyi, R. (2001) A gene expression profile of Alzheimer's disease. *DNA Cell Biol*, **20**, 683-695.
- Lovell, M.A. & Markesbery, W.R. (2007) Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res*, **35**, 7497-7504.
- Lovestone, S., Hartley, C.L., Pearce, J. & Anderton, B.H. (1996) Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules. *Neuroscience*, **73**, 1145-1157.
- Lu, T., Pan, Y., Kao, S.Y., Li, C., Kohane, I., Chan, J. & Yankner, B.A. (2004) Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*, **429**, 883-891.
- Luchsinger, J.A. & Mayeux, R. (2004) Dietary factors and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, **3**, 579-587.
- Lupica, C.R., Bell, J.A., Hoffman, A.F. & Watson, P.L. (2001) Contribution of the hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) to membrane potential and GABA release in hippocampal interneurons. *J Neurophysiol*, **86**, 261-268.
- Luthi, A. & McCormick, D.A. (1998) H-current: properties of a neuronal and network pacemaker. *Neuron*, **21**, 9-12.
- Maccaferri, G. & McBain, C.J. (1996) The hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons. *J Physiol*, **497** ( Pt 1), 119-130.

- Maccioni, R.B., Munoz, J.P. & Barbeito, L. (2001) The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res*, **32**, 367-381.
- Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, M., Yoshiike, Y., Kim, H., Miyasaka, T., Murayama, S., Ikai, A. & Takashima, A. (2007) Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments. *Biochemistry*, **46**, 3856-3861.
- Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, S., Ikai, A. & Takashima, A. (2006) Increased levels of granular tau oligomers: an early sign of brain aging and Alzheimer's disease. *Neurosci Res*, **54**, 197-201.
- Mancillas, J.R., Siggins, G.R. & Bloom, F.E. (1986) Somatostatin selectively enhances acetylcholine-induced excitations in rat hippocampus and cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 7518-7521.
- Maquet, P. (2001) The role of sleep in learning and memory. *Science*, **294**, 1048-1052.
- Marzullo, P., Ferone, D., Di Somma, C., Pivonello, R., Filippella, M., Lombardi, G. & Colao, A. (1999) Efficacy of combined treatment with lanreotide and cabergoline in selected therapy-resistant acromegalic patients. *Pituitary*, **1**, 115-120.
- Mash, D.C., Flynn, D.D. & Potter, L.T. (1985) Loss of M2 muscarine receptors in the cerebral cortex in Alzheimer's disease and experimental cholinergic denervation. *Science*, **228**, 1115-1117.
- Masters, C.L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R.N. & Beyreuther, K. (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *Embo J*, **4**, 2757-2763.
- Matsuo, E.S., Shin, R.W., Billingsley, M.L., Van deVoorde, A., O'Connor, M., Trojanowski, J.Q. & Lee, V.M. (1994) Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron*, **13**, 989-1002.
- Mazanetz, M.P. & Fischer, P.M. (2007) Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov*, **6**, 464-479.
- Mentlein, R., Buchholz, C. & Krisch, B. (1990) Somatostatin-binding sites on rat telencephalic astrocytes. Light- and electron-microscopic studies in vitro and in vivo. *Cell Tissue Res*, **262**, 431-443.
- Meyerhof, W. (1998) The elucidation of somatostatin receptor functions: a current view. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **133**, 55-108.
- Mitchell, V., Bouret, S., Beauvillain, J.C., Schilling, A., Perret, M., Kordon, C. & Epelbaum, J. (2001) Comparative distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) in *Microcebus murinus* (Primate, lemurian) and rat forebrain and pituitary. *J Comp Neurol*, **429**, 469-489.
- Mitsuma, T., Rhue, N., Hirooka, Y., Kayama, M., Mori, Y., Wago, T., Takagi, J., Ping, J., Nogimori, T. & Sakai, J. (1997) Distribution of Somatostatin Receptor Type 3 in the Rat: Immunohistochemical Study. *Endocr Regul*, **31**, 187-192.

- Moller, L.N., Stidsen, C.E., Hartmann, B. & Holst, J.J. (2003) Somatostatin receptors. *Biochim Biophys Acta*, **1616**, 1-84.
- Moreira, P.I., Smith, M.A., Zhu, X., Nunomura, A., Castellani, R.J. & Perry, G. (2005) Oxidative stress and neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*, **1043**, 545-552.
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Titani, K. & Ihara, Y. (1995) Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem*, **270**, 823-829.
- Moritz, D.J. & Petitti, D.B. (1993) Association of education with reported age of onset and severity of Alzheimer's disease at presentation: implications for the use of clinical samples. *Am J Epidemiol*, **137**, 456-462.
- Morsch, R., Simon, W. & Coleman, P.D. (1999) Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol*, **58**, 188-197.
- Mukaetova-Ladinska, E.B., Harrington, C.R., Roth, M. & Wischik, C.M. (1993) Biochemical and anatomical redistribution of tau protein in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, **143**, 565-578.
- Mukaetova-Ladinska, E.B., Harrington, C.R., Roth, M. & Wischik, C.M. (1996) Alterations in tau protein metabolism during normal aging. *Dementia*, **7**, 95-103.
- Murrell, J.R., Spillantini, M.G., Zolo, P., Guazzelli, M., Smith, M.J., Hasegawa, M., Redi, F., Crowther, R.A., Pietrini, P., Ghetti, B. & Goedert, M. (1999) Tau gene mutation G389R causes a tauopathy with abundant pick body-like inclusions and axonal deposits. *J Neuropathol Exp Neurol*, **58**, 1207-1226.
- Nakazawa, K. (2006) Inducible and cell-type restricted manipulation in the entorhinal cortex. *Neuron*, **50**, 183-185.
- Neve, R.L., Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M. & Donlon, T.A. (1986) Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res*, **387**, 271-280.
- Neve, R.L., McPhie, D.L. & Chen, Y. (2000) Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein(1). *Brain Res*, **886**, 54-66.
- Neves, G., Cooke, S.F. & Bliss, T.V. (2008) Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*, **9**, 65-75.
- Nilsson, C.L., Brinkmalm, A., Minthon, L., Blennow, K. & Ekman, R. (2001) Processing of neuropeptide Y, galanin, and somatostatin in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Peptides*, **22**, 2105-2112.
- Nitsch, R.M., Slack, B.E., Wurtman, R.J. & Growdon, J.H. (1992) Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science*, **258**, 304-307.
- Noble, W., Planel, E., Zehr, C., Olm, V., Meyerson, J., Suleman, F., Gaynor, K., Wang, L., LaFrancois, J., Feinstein, B., Burns, M., Krishnamurthy, P., Wen, Y., Bhat, R., Lewis, J., Dickson, D. & Duff, K. (2005) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium

- correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 6990-6995.
- Nordberg, A., Lundqvist, H., Hartvig, P., Lilja, A. & Langstrom, B. (1995) Kinetic analysis of regional (S)(-)11C-nicotine binding in normal and Alzheimer brains--in vivo assessment using positron emission tomography. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, **9**, 21-27.
- Nothacker, H.P., Wang, Z., Zeng, H., Mahata, S.K., O'Connor, D.T. & Civelli, O. (2005) Proadrenomedullin N-terminal peptide and cortistatin activation of MrgX2 receptor is based on a common structural motif. *Eur J Pharmacol*, **519**, 191-193.
- Novak, M., Jakes, R., Edwards, P.C., Milstein, C. & Wischik, C.M. (1991) Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 7.51. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5837-5841.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G. & Barak, L.S. (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem*, **275**, 17201-17210.
- Oh, Y.S. & Turner, R.J. (2005) Topology of the C-terminal fragment of human presenilin 1. *Biochemistry*, **44**, 11821-11828.
- Olias, G., Viollet, C., Kusserow, H., Epelbaum, J. & Meyerhof, W. (2004) Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem*, **89**, 1057-1091.
- Olzmann, J.A., Li, L., Chudaev, M.V., Chen, J., Perez, F.A., Palmiter, R.D. & Chin, L.S. (2007) Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination targets misfolded DJ-1 to aggresomes via binding to HDAC6. *J Cell Biol*, **178**, 1025-1038.
- Ott, A., Stolk, R.P., van Harskamp, F., Pols, H.A., Hofman, A. & Breteler, M.M. (1999) Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology*, **53**, 1937-1942.
- Otvos, L., Jr., Feiner, L., Lang, E., Szendrei, G.I., Goedert, M. & Lee, V.M. (1994) Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *J Neurosci Res*, **39**, 669-673.
- Oyama, F., Kotliarova, S., Harada, A., Ito, M., Miyazaki, H., Ueyama, Y., Hirokawa, N., Nukina, N. & Ihara, Y. (2004) Gem GTPase and tau: morphological changes induced by gem GTPase in cho cells are antagonized by tau. *J Biol Chem*, **279**, 27272-27277.
- Pandey, U.B., Nie, Z., Batlevi, Y., McCray, B.A., Ritson, G.P., Nedelsky, N.B., Schwartz, S.L., DiProspero, N.A., Knight, M.A., Schuldiner, O., Padmanabhan, R., Hild, M., Berry, D.L., Garza, D., Hubbert, C.C., Yao, T.P., Baehrecke, E.H. & Taylor, J.P. (2007) HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*, **447**, 859-863.
- Parameswaran, N. & Spielman, W.S. (2006) RAMPs: the past, present and future. *Trends Biochem Sci*.
- Parnavelas, J.G. & Cavanagh, M.E. (1988) Transient expression of neurotransmitters in the developing neocortex. *Trends Neurosci*, **11**, 92-93.

- Patel, R.C., Kumar, U., Lamb, D.C., Eid, J.S., Rocheville, M., Grant, M., Rani, A., Hazlett, T., Patel, S.C., Gratton, E. & Patel, Y.C. (2002) Ligand binding to somatostatin receptors induces receptor-specific oligomer formation in live cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 3294-3299.
- Patel, Y.C. (1999) Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol*, **20**, 157-198.
- Paudel, H.K. (1997) The regulatory Ser262 of microtubule-associated protein tau is phosphorylated by phosphorylase kinase. *J Biol Chem*, **272**, 1777-1785.
- Pavia, J., de Ceballos, M.L. & Sanchez de la Cuesta, F. (1998) Alzheimer's disease: relationship between muscarinic cholinergic receptors, beta-amyloid and tau proteins. *Fundam Clin Pharmacol*, **12**, 473-481.
- Pei, J.J., Gong, C.X., An, W.L., Winblad, B., Cowburn, R.F., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (2003) Okadaic-acid-induced inhibition of protein phosphatase 2A produces activation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2, MEK1/2, and p70 S6, similar to that in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, **163**, 845-858.
- Perez, J., Vezzani, A., Civenni, G., Tutka, P., Rizzi, M., Schupbach, E. & Hoyer, D. (1995) Functional effects of D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Trp-NH<sub>2</sub> and differential changes in somatostatin receptor messenger RNAs, binding sites and somatostatin release in kainic acid-treated rats. *Neuroscience*, **65**, 1087-1097.
- Perez, M., Arrasate, M., Montejo De Garcini, E., Munoz, V. & Avila, J. (2001) In vitro assembly of tau protein: mapping the regions involved in filament formation. *Biochemistry*, **40**, 5983-5991.
- Perez, M., Lim, F., Arrasate, M. & Avila, J. (2000) The FTDP-17-linked mutation R406W abolishes the interaction of phosphorylated tau with microtubules. *J Neurochem*, **74**, 2583-2589.
- Perez, M., Ribe, E., Rubio, A., Lim, F., Moran, M.A., Ramos, P.G., Ferrer, I., Isla, M.T. & Avila, J. (2005) Characterization of a double (amyloid precursor protein-tau) transgenic: tau phosphorylation and aggregation. *Neuroscience*, **130**, 339-347.
- Perez, M., Valpuesta, J.M., Medina, M., Montejo de Garcini, E. & Avila, J. (1996) Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction. *J Neurochem*, **67**, 1183-1190.
- Perry, E.K., Blessed, G., Tomlinson, B.E., Perry, R.H., Crow, T.J., Cross, A.J., Dockray, G.J., Dimaline, R. & Arregui, A. (1981) Neurochemical activities in human temporal lobe related to aging and Alzheimer-type changes. *Neurobiol Aging*, **2**, 251-256.
- Pfeiffer, M., Koch, T., Schroder, H., Klutzny, M., Kirscht, S., Kreienkamp, H.J., Holtt, V. & Schulz, S. (2001) Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A). *J Biol Chem*, **276**, 14027-14036.
- Pfeiffer, M., Koch, T., Schroder, H., Laugsch, M., Holtt, V. & Schulz, S. (2002) Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *J Biol Chem*, **277**, 19762-19772.

- Phiel, C.J., Wilson, C.A., Lee, V.M. & Klein, P.S. (2003) GSK-3 $\alpha$  regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature*, **423**, 435-439.
- Pierce, K.L., Luttrell, L.M. & Lefkowitz, R.J. (2001) New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene*, **20**, 1532-1539.
- Piggott, M., Owens, J., O'Brien, J., Paling, S., Wyper, D., Fenwick, J., Johnson, M., Perry, R. & Perry, E. (2002) Comparative distribution of binding of the muscarinic receptor ligands pirenzepine, AF-DX 384, (R,R)-I-QNB and (R,S)-I-QNB to human brain. *J Chem Neuroanat*, **24**, 211-223.
- Poenie, M. (1990) Alteration of intracellular Fura-2 fluorescence by viscosity: a simple correction. *Cell Calcium*, **11**, 85-91.
- Poirier, J. (1994) Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, **17**, 525-530.
- Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P. & Gauthier, S. (1993) Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet*, **342**, 697-699.
- Polvikoski, T., Sulkava, R., Haltia, M., Kainulainen, K., Vuorio, A., Verkkoniemi, A., Niinisto, L., Halonen, P. & Kontula, K. (1995) Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of beta-amyloid protein. *N Engl J Med*, **333**, 1242-1247.
- Prince, J.A., Zetterberg, H., Andreasen, N., Marcusson, J. & Blennow, K. (2004) APOE epsilon4 allele is associated with reduced cerebrospinal fluid levels of Abeta42. *Neurology*, **62**, 2116-2118.
- Puig, B., Gomez-Isla, T., Ribe, E., Cuadrado, M., Torrejon-Escribano, B., Dalfo, E. & Ferrer, I. (2004) Expression of stress-activated kinases c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK-P) and p38 kinase (p38-P), and tau hyperphosphorylation in neurites surrounding betaA plaques in APP Tg2576 mice. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **30**, 491-502.
- Purdy, K.S., McMullen, P.A. & Freedman, M. (2002) Changes to the object recognition system in patients with dementia of the Alzheimer's type. *Brain Cogn*, **49**, 213-216.
- Raber, J., Huang, Y. & Ashford, J.W. (2004) ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol Aging*, **25**, 641-650.
- Rahman, A., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (2006) PP2B isolated from human brain preferentially dephosphorylates Ser-262 and Ser-396 of the Alzheimer disease abnormally hyperphosphorylated tau. *J Neural Transm*, **113**, 219-230.
- Ramirez, J.L., Mouchantaf, R., Kumar, U., Otero Corchon, V., Rubinstein, M., Low, M.J. & Patel, Y.C. (2002) Brain somatostatin receptors are up-regulated in somatostatin-deficient mice. *Mol Endocrinol*, **16**, 1951-1963.
- Rapoport, M., Dawson, H.N., Binder, L.I., Vitek, M.P. & Ferreira, A. (2002) Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6364-6369.
- Raschetti, R., Albanese, E., Vanacore, N. & Maggini, M. (2007) Cholinesterase inhibitors in mild cognitive impairment: a systematic review of randomised trials. *PLoS Med*, **4**, e338.

- Ratovitski, T., Slunt, H.H., Thinakaran, G., Price, D.L., Sisodia, S.S. & Borchelt, D.R. (1997) Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin. *J Biol Chem*, **272**, 24536-24541.
- Rauca, C., Schafer, K. & Holtt, V. (1999) Effects of somatostatin, octreotide and cortistatin on ischaemic neuronal damage following permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **360**, 633-638.
- Reed, J.M. & Squire, L.R. (1998) Retrograde amnesia for facts and events: findings from four new cases. *J Neurosci*, **18**, 3943-3954.
- Rendon, A., Jung, D. & Jancsik, V. (1990) Interaction of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs) with rat brain mitochondria. *Biochem J*, **269**, 555-556.
- Reubi, J.C., Waser, B., Schaer, J.C. & Laissue, J.A. (2001) Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur J Nucl Med*, **28**, 836-846.
- Reynolds, C.H., Garwood, C.J., Wray, S., Price, C., Kellie, S., Perera, T., Zvelebil, M., Yang, A., Sheppard, P.W., Varndell, I.M., Hanger, D.P. & Anderton, B.H. (2008) Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases. *J Biol Chem*, **283**, 18177-18186.
- Reynolds, M.R., Berry, R.W. & Binder, L.I. (2005) Site-specific nitration differentially influences tau assembly in vitro. *Biochemistry*, **44**, 13997-14009.
- Rezek, M., Havlicek, V., Hughes, K.R. & Friesen, H. (1976) Cortical administration of somatostatin (SRIF): effect on sleep & motor behavior. *Pharmacol Biochem Behav*, **5**, 73-77.
- Ribalet, B. & Eddlestone, G.T. (1995) Characterization of the G protein coupling of a somatostatin receptor to the K+ATP channel in insulin-secreting mammalian HIT and RIN cell lines. *J Physiol*, **485 ( Pt 1)**, 73-86.
- Robas, N., Mead, E. & Fidock, M. (2003) MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion. *J Biol Chem*, **278**, 44400-44404.
- Roberson, E.D., Searce-Levie, K., Palop, J.J., Yan, F., Cheng, I.H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G.Q. & Mucke, L. (2007) Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science*, **316**, 750-754.
- Rocheville, M., Lange, D.C., Kumar, U., Patel, S.C., Patel, R.C. & Patel, Y.C. (2000a) Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science*, **288**, 154-157.
- Rocheville, M., Lange, D.C., Kumar, U., Sasi, R., Patel, R.C. & Patel, Y.C. (2000b) Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem*, **275**, 7862-7869.
- Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J.H., Gu, Y., Kawarai, T., Zou, F., Katayama, T., Baldwin, C.T., Cheng, R., Hasegawa, H., Chen, F., Shibata, N., Lunetta, K.L., Pardossi-Piquard, R., Bohm, C., Wakutani, Y., Cupples, L.A., Cuenco, K.T., Green, R.C., Pinessi, L., Rainero, I., Sorbi, S., Bruni, A., Duara, R., Friedland, R.P., Inzelberg, R., Hampe, W., Bujo, H.,



- Song, Y.Q., Andersen, O.M., Willnow, T.E., Graff-Radford, N., Petersen, R.C., Dickson, D., Der, S.D., Fraser, P.E., Schmitt-Ulms, G., Younkin, S., Mayeux, R., Farrer, L.A. and St George-Hyslop, P. (2007) The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet*, **39**, 168-177.
- Roosterman, D., Roth, A., Kreienkamp, H.J., Richter, D. & Meyerhof, W. (1997) Distinct agonist-mediated endocytosis of cloned rat somatostatin receptor subtypes expressed in insulinoma cells. *J Neuroendocrinol*, **9**, 741-751.
- Rosati, A.M., Guarnieri, E., Avignone, E., Cherubini, E., Cattaneo, A. & Traversa, U. (1999) Increased density of M1 receptors in the hippocampus of juvenile rats chronically deprived of NGF. *Brain Res*, **815**, 185-191.
- Roth, A., Kreienkamp, H.J., Nehring, R.B., Roosterman, D., Meyerhof, W. & Richter, D. (1997) Endocytosis of the rat somatostatin receptors: subtype discrimination, ligand specificity, and delineation of carboxy-terminal positive and negative sequence motifs. *DNA Cell Biol*, **16**, 111-119.
- Rowan, M.J., Klyubin, I., Wang, Q., Hu, N.W. & Anwyl, R. (2007) Synaptic memory mechanisms: Alzheimer's disease amyloid beta-peptide-induced dysfunction. *Biochem Soc Trans*, **35**, 1219-1223.
- Roy, S., Zhang, B., Lee, V.M. & Trojanowski, J.Q. (2005) Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol*, **109**, 5-13.
- Sahara, N., Maeda, S., Murayama, M., Suzuki, T., Dohmae, N., Yen, S.H. & Takashima, A. (2007) Assembly of two distinct dimers and higher-order oligomers from full-length tau. *Eur J Neurosci*, **25**, 3020-3029.
- Saido, T.C. & Iwata, N. (2006) Metabolism of amyloid beta peptide and pathogenesis of Alzheimer's disease. Towards presymptomatic diagnosis, prevention and therapy. *Neurosci Res*, **54**, 235-253.
- Saito, T., Ishiguro, K., Uchida, T., Miyamoto, E., Kishimoto, T. & Hisanaga, S. (1995) In situ dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 2B in fetal rat primary cultured neurons. *FEBS Lett*, **376**, 238-242.
- Saito, T., Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Takano, J., Huang, S.M., Suemoto, T., Higuchi, M. & Saido, T.C. (2005) Somatostatin regulates brain amyloid beta peptide Abeta42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat Med*, **11**, 434-439.
- Salehi, A., Delcroix, J.D. & Mobley, W.C. (2003) Traffic at the intersection of neurotrophic factor signaling and neurodegeneration. *Trends Neurosci*, **26**, 73-80.
- Santa-Maria, I., Hernandez, F., Smith, M.A., Perry, G., Avila, J. & Moreno, F.J. (2005) Neurotoxic dopamine quinone facilitates the assembly of tau into fibrillar polymers. *Mol Cell Biochem*, **278**, 203-212.
- Santacruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., DeTure, M., Ramsden, M., McGowan, E., Forster, C., Yue, M., Orne, J., Janus, C., Mariash, A., Kuskowski, M., Hyman, B., Hutton, M. & Ashe, K.H. (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*, **309**, 476-481.

- Scott, C.W., Spreen, R.C., Herman, J.L., Chow, F.P., Davison, M.D., Young, J. & Caputo, C.B. (1993) Phosphorylation of recombinant tau by cAMP-dependent protein kinase. Identification of phosphorylation sites and effect on microtubule assembly. *J Biol Chem*, **268**, 1166-1173.
- Scoville, W.B. & Milner, B. (2000) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, **12**, 103-113.
- Schindler, M., Harrington, K.A., Humphrey, P.P. & Emson, P.C. (1995) Cellular localisation and co-expression of somatostatin receptor messenger RNAs in the human brain. *Brain Res Mol Brain Res*, **34**, 321-326.
- Schindler, M., Humphrey, P.P. & Emson, P.C. (1996) Somatostatin receptors in the central nervous system. *Prog Neurobiol*, **50**, 9-47.
- Schindler, M., Humphrey, P.P., Lohrke, S. & Friauf, E. (1999) Immunohistochemical localization of the somatostatin sst2(b) receptor splice variant in the rat central nervous system. *Neuroscience*, **90**, 859-874.
- Schindler, M., Sellers, L.A., Humphrey, P.P. & Emson, P.C. (1997) Immunohistochemical localization of the somatostatin SST2(A) receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience*, **76**, 225-240.
- Schneider, A., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E. & Mandelkow, E.M. (1999) Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry*, **38**, 3549-3558.
- Schneider, A. & Mandelkow, E. (2008) Tau-based treatment strategies in neurodegenerative diseases. *Neurotherapeutics*, **5**, 443-457.
- Schonbrunn, A. & Tashjian, H., Jr. (1978) Characterization of functional receptors for somatostatin in rat pituitary cells in culture. *J Biol Chem*, **253**, 6473-6483.
- Schreff, M., Schulz, S., Handel, M., Keilhoff, G., Braun, H., Pereira, G., Klutzny, M., Schmidt, H., Wolf, G. & Holtt, V. (2000) Distribution, targeting, and internalization of the sst4 somatostatin receptor in rat brain. *J Neurosci*, **20**, 3785-3797.
- Schulz, S., Handel, M., Schreff, M., Schmidt, H. & Holtt, V. (2000) Localization of five somatostatin receptors in the rat central nervous system using subtype-specific antibodies. *J Physiol Paris*, **94**, 259-264.
- Schweitzer, P., Madamba, S.G. & Siggins, G.R. (2003) The sleep-modulating peptide cortistatin augments the h-current in hippocampal neurons. *J Neurosci*, **23**, 10884-10891.
- Selkoe, D.J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, **81**, 741-766.
- Selmer, I., Schindler, M., Allen, J.P., Humphrey, P.P. & Emson, P.C. (2000) Advances in understanding neuronal somatostatin receptors. *Regul Pept*, **90**, 1-18.

- Sengupta, A., Kabat, J., Novak, M., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (1998) Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules. *Arch Biochem Biophys*, **357**, 299-309.
- Seubert, P., Mawal-Dewan, M., Barbour, R., Jakes, R., Goedert, M., Johnson, G.V., Litersky, J.M., Schenk, D., Lieberburg, I., Trojanowski, J.Q. & et al. (1995) Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J Biol Chem*, **270**, 18917-18922.
- Seubert, P., Oltersdorf, T., Lee, M.G., Barbour, R., Blomquist, C., Davis, D.L., Bryant, K., Fritz, L.C., Galasko, D., Thal, L.J. & et al. (1993) Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature*, **361**, 260-263.
- Shenoy, S.K. & Lefkowitz, R.J. (2003) Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J Biol Chem*, **278**, 14498-14506.
- Shenoy, S.K., McDonald, P.H., Kohout, T.A. & Lefkowitz, R.J. (2001) Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science*, **294**, 1307-1313.
- Shin, R.W., Iwaki, T., Kitamoto, T., Sato, Y. & Tateishi, J. (1992) Massive accumulation of modified tau and severe depletion of normal tau characterize the cerebral cortex and white matter of Alzheimer's disease. Demonstration using the hydrated autoclaving method. *Am J Pathol*, **140**, 937-945.
- Shirotani, K., Tsubuki, S., Iwata, N., Takaki, Y., Harigaya, W., Maruyama, K., Kiryu-Seo, S., Kiyama, H., Iwata, H., Tomita, T., Iwatsubo, T. & Saido, T.C. (2001) Neprilysin degrades both amyloid beta peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases. *J Biol Chem*, **276**, 21895-21901.
- Shiurba, R.A., Ishiguro, K., Takahashi, M., Sato, K., Spooner, E.T., Mercken, M., Yoshida, R., Wheelock, T.R., Yanagawa, H., Imahori, K. & Nixon, R.A. (1996) Immunocytochemistry of tau phosphoserine 413 and tau protein kinase I in Alzheimer pathology. *Brain Res*, **737**, 119-132.
- Sibilia, V., Muccioli, G., Deghenghi, R., Pagani, F., De Luca, V., Rapetti, D., Locatelli, V. & Netti, C. (2006) Evidence for a role of the GHS-R1a receptors in ghrelin inhibition of gastric acid secretion in the rat. *J Neuroendocrinol*, **18**, 122-128.
- Siehl, S., Nunn, C., Hannon, J., Feuerbach, D. & Hoyer, D. (2007) Pharmacological profile of somatostatin and cortistatin receptors. *Mol Cell Endocrinol*.
- Siehl, S., Seuwen, K. & Hoyer, D. (1998) [125I]Tyr10-cortistatin14 labels all five somatostatin receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **357**, 483-489.
- Singh, T.J., Grundke-Iqbal, I., McDonald, B. & Iqbal, K. (1994) Comparison of the phosphorylation of microtubule-associated protein tau by non-proline dependent protein kinases. *Mol Cell Biochem*, **131**, 181-189.

- Singh, T.J., Wang, J.Z., Novak, M., Kontzekova, E., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (1996) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylates tau at Ser-262 but only partially inhibits its binding to microtubules. *FEBS Lett*, **387**, 145-148.
- Sironi, J.J., Yen, S.H., Gondal, J.A., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (1998) Ser-262 in human recombinant tau protein is a markedly more favorable site for phosphorylation by CaMKII than PKA or PhK. *FEBS Lett*, **436**, 471-475.
- Smith, A.D. (2002) Imaging the progression of Alzheimer pathology through the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4135-4137.
- Sontag, E., Luangpirom, A., Hladik, C., Mudrak, I., Ogris, E., Speciale, S. & White, C.L., 3rd. (2004) Altered expression levels of the protein phosphatase 2A A $\beta$ Alphac enzyme are associated with Alzheimer disease pathology. *J Neuropathol Exp Neurol*, **63**, 287-301.
- Sontag, E., Nunbhakdi-Craig, V., Lee, G., Bloom, G.S. & Mumby, M.C. (1996) Regulation of the phosphorylation state and microtubule-binding activity of Tau by protein phosphatase 2A. *Neuron*, **17**, 1201-1207.
- Sontag, E., Nunbhakdi-Craig, V., Lee, G., Brandt, R., Kamibayashi, C., Kuret, J., White, C.L., 3rd, Mumby, M.C. & Bloom, G.S. (1999) Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. *J Biol Chem*, **274**, 25490-25498.
- Spier, A.D. & de Lecea, L. (2000) Cortistatin: a member of the somatostatin neuropeptide family with distinct physiological functions. *Brain Res Brain Res Rev*, **33**, 228-241.
- Spier, A.D., Fabre, V. & de Lecea, L. (2005) Cortistatin radioligand binding in wild-type and somatostatin receptor-deficient mouse brain. *Regul Pept*, **124**, 179-186.
- Squire, L.R., Stark, C.E. & Clark, R.E. (2004) The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci*, **27**, 279-306.
- Squire, L.R. & Zola-Morgan, S. (1991) The medial temporal lobe memory system. *Science*, **253**, 1380-1386.
- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E. & Mandelkow, E.M. (2002) Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol*, **156**, 1051-1063.
- Stanford, P.M., Shepherd, C.E., Halliday, G.M., Brooks, W.S., Schofield, P.W., Brodaty, H., Martins, R.N., Kwok, J.B. & Schofield, P.R. (2003) Mutations in the tau gene that cause an increase in three repeat tau and frontotemporal dementia. *Brain*, **126**, 814-826.
- Steriade, M. (2004) Acetylcholine systems and rhythmic activities during the waking-sleep cycle. *Prog Brain Res*, **145**, 179-196.
- Stickgold, R. (2005) Sleep-dependent memory consolidation. *Nature*, **437**, 1272-1278.
- Stickgold, R., Hobson, J.A., Fosse, R. & Fosse, M. (2001) Sleep, learning, and dreams: off-line memory reprocessing. *Science*, **294**, 1052-1057.

- Stroh, T., Jackson, A.C., Dal Farra, C., Schonbrunn, A., Vincent, J.P. & Beaudet, A. (2000) Receptor-mediated internalization of somatostatin in rat cortical and hippocampal neurons. *Synapse*, **38**, 177-186.
- Stroh, T., Kreienkamp, H.J. & Beaudet, A. (1999) Immunohistochemical distribution of the somatostatin receptor subtype 5 in the adult rat brain: predominant expression in the basal forebrain. *J Comp Neurol*, **412**, 69-82.
- Suzuki, W.A. (2007) Making new memories: the role of the hippocampus in new associative learning. *Ann N Y Acad Sci*, **1097**, 1-11.
- Takaki, Y., Iwata, N., Tsubuki, S., Taniguchi, S., Toyoshima, S., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Lee, H.J., Shirotani, K. & Saido, T.C. (2000) Biochemical identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid beta peptide in the brain. *J Biochem*, **128**, 897-902.
- Takashima, A., Murayama, M., Murayama, O., Kohno, T., Honda, T., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Mercken, M., Yamaguchi, H., Sugihara, S. & Wolozin, B. (1998) Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9637-9641.
- Takashima, A., Petersson, K.M., Rutters, F., Tendolkar, I., Jensen, O., Zwarts, M.J., McNaughton, B.L. & Fernandez, G. (2006) Declarative memory consolidation in humans: a prospective functional magnetic resonance imaging study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 756-761.
- Tallent, M.K., Fabre, V., Qiu, C., Calbet, M., Lamp, T., Baratta, M.V., Suzuki, C., Levy, C.L., Siggins, G.R., Henriksen, S.J., Criado, J.R., Roberts, A. & de Lecea, L. (2005) Cortistatin overexpression in transgenic mice produces deficits in synaptic plasticity and learning. *Mol Cell Neurosci*, **30**, 465-475.
- Tallent, M.K. & Qiu, C. (2007) Somatostatin: An endogenous antiepileptic. *Mol Cell Endocrinol*.
- Tallent, M.K. & Siggins, G.R. (1997) Somatostatin depresses excitatory but not inhibitory neurotransmission in rat CA1 hippocampus. *J Neurophysiol*, **78**, 3008-3018.
- Tatebayashi, Y., Haque, N., Tung, Y.C., Iqbal, K. & Grundke-Iqbal, I. (2004) Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of organelle transport. *J Cell Sci*, **117**, 1653-1663.
- Tostivint, H., Joly, L., Lihrmann, I., Parmentier, C., Lebon, A., Morisson, M., Calas, A., Ekker, M. & Vaudry, H. (2006) Comparative genomics provides evidence for close evolutionary relationships between the urotensin II and somatostatin gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 2237-2242.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Tran, A.D., Marmo, T.P., Salam, A.A., Che, S., Finkelstein, E., Kabarriti, R., Xenias, H.S., Mazitschek, R., Hubbert, C., Kawaguchi, Y., Sheetz, M.P., Yao, T.P. & Bulinski, J.C. (2007) HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *J Cell Sci*, **120**, 1469-1479.

- Trinczek, B., Ebner, A., Mandelkow, E.M. & Mandelkow, E. (1999) Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles. *J Cell Sci*, **112** ( Pt 14), 2355-2367.
- Trinh, N.H., Hoblyn, J., Mohanty, S. & Yaffe, K. (2003) Efficacy of cholinesterase inhibitors in the treatment of neuropsychiatric symptoms and functional impairment in Alzheimer disease: a meta-analysis. *Jama*, **289**, 210-216.
- Trojanowski, J.Q., Schuck, T., Schmidt, M.L. & Lee, V.M. (1989) Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system. *J Histochem Cytochem*, **37**, 209-215.
- Trojanowski, J.Q., Smith, A.B., Hurn, D. & Lee, V.M. (2005) Microtubule-stabilising drugs for therapy of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders with axonal transport impairments. *Expert Opin Pharmacother*, **6**, 683-686.
- Tulipano, G. & Schulz, S. (2007) Novel insights in somatostatin receptor physiology. *Eur J Endocrinol*, **156 Suppl 1**, S3-11.
- van Calcar, D., Muller, M. & Hamprecht, B. (1980) Regulation by secretin, vasoactive intestinal peptide, and somatostatin of cyclic AMP accumulation in cultured brain cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 6907-6911.
- Vanetti, M., Vogt, G. & Holtt, V. (1993) The two isoforms of the mouse somatostatin receptor (mSSTR2A and mSSTR2B) differ in coupling efficiency to adenylate cyclase and in agonist-induced receptor desensitization. *FEBS Lett*, **331**, 260-266.
- Vanetti, M., Ziolkowska, B., Wang, X., Horn, G. & Holtt, V. (1994) mRNA distribution of two isoforms of somatostatin receptor 2 (mSSTR2A and mSSTR2B) in mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res*, **27**, 45-50.
- Vasilaki, A., Lanneau, C., Dournaud, P., De Lecea, L., Gardette, R. & Epelbaum, J. (1999) Cortistatin affects glutamate sensitivity in mouse hypothalamic neurons through activation of sst2 somatostatin receptor subtype. *Neuroscience*, **88**, 359-364.
- Vazquez-Palacios, G. & Bonilla-Jaime, H. (2004) [Nicotine acetylcholine receptors and neuropsychiatric disorders]. *Rev Neurol*, **39**, 1146-1160.
- Veber, D.F., Holly, F.W., Nutt, R.F., Bergstrand, S.J., Brady, S.F., Hirschmann, R., Glitzer, M.S. & Saperstein, R. (1979) Highly active cyclic and bicyclic somatostatin analogues of reduced ring size. *Nature*, **280**, 512-514.
- Vezzani, A., Serafini, R., Stasi, M.A., Vigano, G., Rizzi, M. & Samanin, R. (1991) A peptidase-resistant cyclic octapeptide analogue of somatostatin (SMS 201-995) modulates seizures induced by quinolinic and kainic acids differently in the rat hippocampus. *Neuropharmacology*, **30**, 345-352.
- Videau, C., Hochgeschwender, U., Kreienkamp, H.J., Brennan, M.B., Viollet, C., Richter, D. & Epelbaum, J. (2003) Characterisation of [125I]-Tyr0DTrp8-somatostatin binding in sst1- to sst4- and SRIF-gene-invalidated mouse brain. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **367**, 562-571.

- Vogelsberg-Ragaglia, V., Schuck, T., Trojanowski, J.Q. & Lee, V.M. (2001) PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus. *Exp Neurol*, **168**, 402-412.
- Volpicelli, L.A. & Levey, A.I. (2004) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Prog Brain Res*, **145**, 59-66.
- Wang, J.Z., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (2007) Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci*, **25**, 59-68.
- Wang, J.Z. & Liu, F. (2008) Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog Neurobiol*.
- Weckbecker, G., Lewis, I., Albert, R., Schmid, H.A., Hoyer, D. & Bruns, C. (2003) Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat Rev Drug Discov*, **2**, 999-1017.
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y. & Kirschner, M.W. (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 1858-1862.
- Wess, J., Eglen, R.M. & Gautam, D. (2007) Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov*, **6**, 721-733.
- Wiltgen, B.J., Brown, R.A., Talton, L.E. & Silva, A.J. (2004) New circuits for old memories: the role of the neocortex in consolidation. *Neuron*, **44**, 101-108.
- Winsky-Sommerer, R., Spier, A.D., Fabre, V., de Lecea, L. & Criado, J.R. (2004) Overexpression of the human beta-amyloid precursor protein downregulates cortistatin mRNA in PDAPP mice. *Brain Res*, **1023**, 157-162.
- Winters, B.D., Saksida, L.M. & Bussey, T.J. (2008) Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev*, **32**, 1055-1070.
- Witman, G.B., Cleveland, D.W., Weingarten, M.D. & Kirschner, M.W. (1976) Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 4070-4074.
- Witter, M.P., Van Hoesen, G.W. & Amaral, D.G. (1989) Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. *J Neurosci*, **9**, 216-228.
- Wittmann, C.W., Wszolek, M.F., Shulman, J.M., Salvaterra, P.M., Lewis, J., Hutton, M. & Feany, M.B. (2001) Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science*, **293**, 711-714.
- Woolley, M.L., Marsden, C.A., Sleight, A.J. & Fone, K.C. (2003) Reversal of a cholinergic-induced deficit in a rodent model of recognition memory by the selective 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist, Ro 04-6790. *Psychopharmacology (Berl)*, **170**, 358-367.
- Xiao-Chuan, W., Zheng-Hui, H., Zheng-Yu, F., Yue, F., Yun-Huang, Y., Qun, W., Xiao-Wei, T., Yi-Gen, W. & Jian-Zhi, W. (2004) Correlation of Alzheimer-like tau hyperphosphorylation and fMRI bold intensity. *Curr Alzheimer Res*, **1**, 143-148.

- Yamada, Y., Post, S.R., Wang, K., Tager, H.S., Bell, G.I. & Seino, S. (1992) Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 251-255.
- Yasojima, K., Akiyama, H., McGeer, E.G. & McGeer, P.L. (2001) Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci Lett*, **297**, 97-100.
- Yasuda, M. & Mayford, M.R. (2006) CaMKII activation in the entorhinal cortex disrupts previously encoded spatial memory. *Neuron*, **50**, 309-318.
- Yoshida, M. (2006) Cellular tau pathology and immunohistochemical study of tau isoforms in sporadic tauopathies. *Neuropathology*, **26**, 457-470.
- Yuan, A., Kumar, A., Peterhoff, C., Duff, K. & Nixon, R.A. (2008) Axonal transport rates in vivo are unaffected by tau deletion or overexpression in mice. *J Neurosci*, **28**, 1682-1687.
- Zhang, B., Maiti, A., Shively, S., Lakhani, F., McDonald-Jones, G., Bruce, J., Lee, E.B., Xie, S.X., Joyce, S., Li, C., Toleikis, P.M., Lee, V.M. & Trojanowski, J.Q. (2005) Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 227-231.
- Zhang, F., Eckman, C., Younkin, S., Hsiao, K.K. & Iadecola, C. (1997) Increased susceptibility to ischemic brain damage in transgenic mice overexpressing the amyloid precursor protein. *J Neurosci*, **17**, 7655-7661.
- Zhang, J., Ferguson, S.S., Barak, L.S., Menard, L. & Caron, M.G. (1996) Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem*, **271**, 18302-18305.
- Zhang, X., Yuan, Z., Zhang, Y., Yong, S., Salas-Burgos, A., Koomen, J., Olashaw, N., Parsons, J.T., Yang, X.J., Dent, S.R., Yao, T.P., Lane, W.S. & Seto, E. (2007) HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol Cell*, **27**, 197-213.
- Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M.E., Sirinathsinghji, D.J., Hopkins, R., Smith, D.W., Heavens, R.P., Dawson, G.R., Boyce, S., Conner, M.W., Stevens, K.A., Slunt, H.H., Sisoda, S.S., Chen, H.Y. & Van der Ploeg, L.H. (1995) beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell*, **81**, 525-531.
- Zigman, J.M., Jones, J.E., Lee, C.E., Saper, C.B. & Elmquist, J.K. (2006) Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol*, **494**, 528-548.
- Zuchner, T., Perez-Polo, J.R. & Schliebs, R. (2004) Beta-secretase BACE1 is differentially controlled through muscarinic acetylcholine receptor signaling. *J Neurosci Res*, **77**, 250-257.
- Zuchner, T., Schliebs, R. & Perez-Polo, J.R. (2005) Down-regulation of muscarinic acetylcholine receptor M2 adversely affects the expression of Alzheimer's disease-relevant genes and proteins. *J Neurochem*, **95**, 20-32.



---

**Anexo**



## CHARACTERIZATION OF A DOUBLE (AMYLOID PRECURSOR PROTEIN-TAU) TRANSGENIC: TAU PHOSPHORYLATION AND AGGREGATION

M. PÉREZ,<sup>a</sup> E. RIBE,<sup>b</sup> A. RUBIO,<sup>a</sup> F. LIM,<sup>a</sup> M. A. MORÁN,<sup>c</sup> P. GÓMEZ RAMOS,<sup>c</sup> I. FERRER,<sup>d</sup> M. T. G. ISLA<sup>b</sup> AND J. AVILA<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa,” Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

<sup>b</sup>Departamento de Neurología, Clínica Universitaria de Navarra, Universidad de Navarra, Pamplona, Navarra, Spain

<sup>c</sup>Facultad de Medicina, Dpto. de Morfología Universidad Autónoma de Madrid, CI Arzobispo Morcillo s/n., 28029 Madrid, Spain

<sup>d</sup>Instituto de Neuropatología, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Bellvitge, Universidad de Barcelona, 08907 Hospitalet de Llobregat, Spain

**Abstract**—A double transgenic mouse expressing the amyloid precursor protein, bearing the Swedish mutations, and expressing tau protein containing three of the mutations present in frontotemporal dementia linked to chromosome 17 (FTDP-17), has been characterized. In the double transgenic mouse an increase in tau phosphorylation at serine S262 and S422 was observed compared with that found in simple transgenic mice. The phosphorylation at S262 was also found, in a much lower level, in the single transgenic mouse expressing amyloid precursor protein (APP), and it was absent in that overexpressing tau variant. Additionally, in the double transgenic mouse a slight increase in the amount of sarkosyl insoluble tau polymers was observed in comparison with that found in single transgenic tau mouse. Also, wider tau filaments were found in the double transgenic mouse compared with those found in the single transgenic mouse.

Our results suggest that  $\beta$ -amyloid peptide could facilitate the phosphorylation of tau at a site not directed by proline, such as serine 262, and that modification could facilitate tau aberrant aggregation. Also, they suggest that different types of tau filamentous polymers can occur in different mouse models for tauopathies, like those used for Alzheimer's disease or FTDP-17. © 2004 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** beta-amyloid aggregates, tau polymers, phosphorylation, Alzheimer's disease, FTDP-17, kinases.

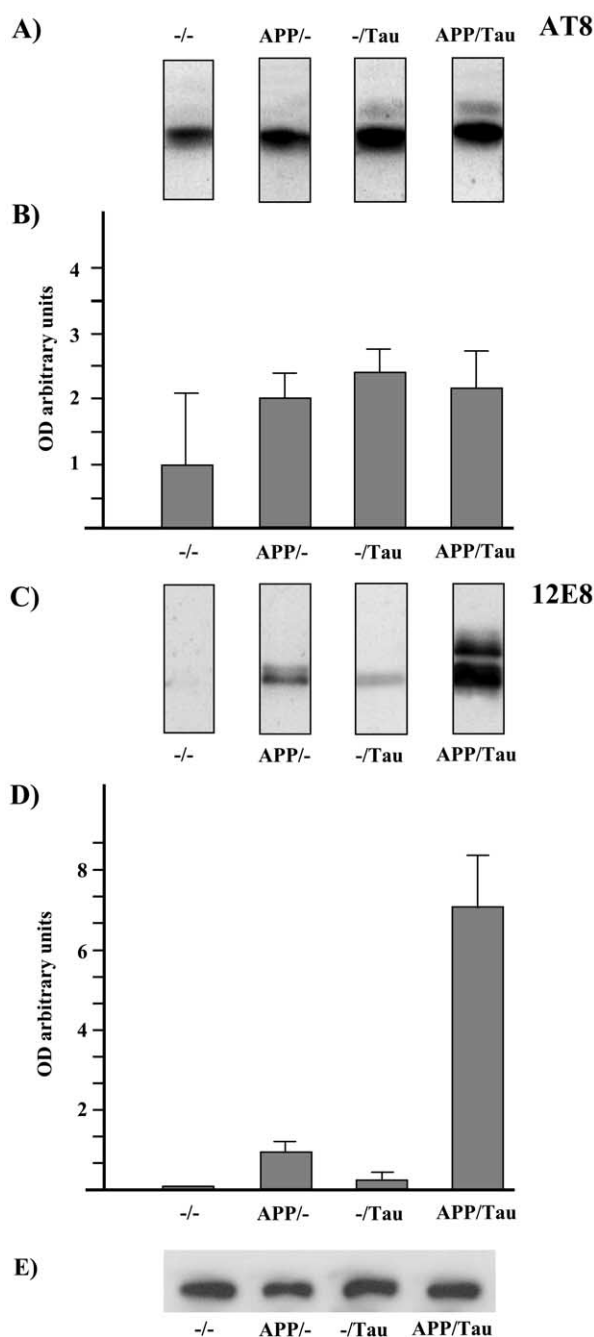
Alzheimer's disease (AD) is characterized by the presence of two aberrant structures, senile plaques and neurofibrillary tangles, present in the brain of the patients (Alzheimer, 1907). Senile plaques are mainly composed of aggregates of a peptide,  $\beta$ -amyloid peptide (A $\beta$ ), that arises from the proteolytic cleavage of a precursor protein, APP (Glenner and Wong, 1984). In contrast, the main component of neurofibrillary tangles is tau protein in hyperphosphorylated form (Grundke-Iqbal et al., 1986). There is a hypothesis, the amyloid cascade hypothesis, suggesting that there is a link between the presence of A $\beta$  and the phosphorylation and assembly of tau protein (Hardy and Selkoe, 2002). In this way, it has been suggested that the presence of  $\beta$ -amyloid could facilitate the phosphorylation of tau protein at both proline directed sites phosphorylated (PDP; Morishima-Kawashima et al., 1995) and non-proline directed sites phosphorylated (NPDP; Geula et al., 1998; Xie et al., 2002; Ferrari et al., 2003). In the first case A $\beta$  could act as an antagonist of insulin receptor (Xie et al., 2002), facilitating the activation of GSK3, a PDP kinase; also, the role of A $\beta$  in activation of NPD sites has been suggested (Geula et al., 1998). There are some indications supporting the amyloid cascade hypothesis. For example, Gotz et al., 2001 and Lewis et al., 2001 have found that the presence of amyloid peptide increases the formation of aberrant (sarkosyl insoluble) tau aggregates. On the other hand, studies in human AD cases following  $\beta$ -amyloid immunization, have shown a decreased amyloid burden, and decreased phosphorylated tau in neurites surrounding amyloid plaques, but not a reduction of neurofibrillary tangles (NFTs; Nicoll et al., 2003; Ferrer et al., 2004). These findings suggest that tau phosphorylation in dystrophic neurites of senile plaques, but not necessarily phosphorylation of tau in NFTs, is related with amyloid accumulation. Additionally, Rapoport et al., 2002 noted that the toxic effect of  $\beta$ -amyloid could not take place in cells lacking tau protein.

In contrast, in other tauopathies such as frontotemporal dementia linked to chromosome 17 (FTDP-17), the phosphorylation and formation of tau aggregates takes place independently of the presence of  $\beta$ -amyloid (Spillantini et al., 1998). Several mouse models expressing tau, bearing different mutations present in FTDP-17 patients, have been developed. In some of these models, but not in those expressing wild type tau, aberrant phosphotau aggregates were found (Brion et al., 1999; Ishihara et al., 1999; Spittaels et al., 1999; Probst et al., 2000; Gotz et al., 2001; Lewis et al., 2001; Lim et al., 2001; Allen et al., 2002;

\*Corresponding author. Tel: +34-91-497-8440; fax: +34-91-497-4799.

E-mail address: javila@cbm.uam.es (J. Avila).

**Abbreviations:** A $\beta$ ,  $\beta$ -amyloid peptide; AD, Alzheimer's disease; APP, amyloid precursor protein; APP<sup>sw</sup> mouse, mouse expressing APP containing the double mutation K670N and M671L; APP<sup>sw</sup>/tau<sup>wt</sup> mouse, double transgenic mouse expressing the above mentioned mutations in both APP and tau genes; FTDP-17, frontotemporal dementia linked to chromosome 17; NFTs, neurofibrillary tangles; NPDP, non-proline directed sites phosphorylated; PDP, proline directed sites phosphorylated; tau<sup>wt</sup> mouse, a mouse expressing the mutations G272V, P301L and R406W, found in FTDP-17.



**Fig. 1.** Interaction of antibodies reacting with PDP and NPDP sites in tau protein with tau from different sources. (A) Tau from wild type (wt), transgenic APP<sup>sw</sup>, transgenic tau<sup>vw</sup> and double transgenic APP<sup>sw</sup>/tau<sup>vw</sup> was isolated from a brain cell extract and its reaction with ab AT8 was measured by Western blot, using the same amount of protein, as determined by measuring tubulin concentration by Western blot. The brain of each animal was divided in two halves, and the left half was used to prepare the brain cell extract and to carry out the Western-blot analysis. Male mice, 9 months of age were analyzed. For the analysis the left half of the whole brain was used. Twelve mice were tested, three for each condition (wt, APP<sup>sw</sup>, tau<sup>vw</sup> and APP<sup>sw</sup>/tau<sup>vw</sup>). The average of three determinants is shown. Similar results were found for 16-month-old mice. (B) Quantitation of the results from (A). The quantitation of tau reacting with AT8 was carried out by densitometric analysis (OD) yielding arbitrary units (au). Since an increase in total

Tanemura et al., 2002; Tatebayashi et al., 2002; Boutajangout et al., 2004).

In this work, we have tested whether the presence of A $\beta$ , in aggregated form, may increase the phosphorylation and formation of sarkosyl insoluble tau aggregates. To do this we have characterized a double transgenic mouse generated from Tg2576, a mouse expressing APP containing the double mutation K670N and M671L, crossed with a mouse expressing the mutations G272V, P301L and R406W, found in FTDP-17. Our results indicate that the presence of A $\beta$  aggregates significantly facilitates the phosphorylation of tau at an NPD site like that of Ser 262 and the formation of new sarkosyl insoluble aggregates.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Transgenic mice

A double Tg line was obtained by crossing Tg2576 and VLW lines. The progeny included double mutant APP (APP<sup>sw</sup>)/mutant tau (tau<sup>vw</sup>) (hereafter termed APP<sup>sw</sup>-tau<sup>vw</sup>), mutant APP (APP<sup>sw</sup>), mutant tau (tau<sup>vw</sup>), and non-transgenic animals.

Detailed characterization of APP<sup>sw</sup> and tau<sup>vw</sup> lines have been previously published elsewhere (Mullan et al., 1992; Lim et al., 2001). In brief, the Tg2576 line overexpresses human APP containing the double Swedish mutation K670N-M671L (swe) under the control of the hamster prion protein promoter in a C57Bl6jxSjL hybrid background. Tg2576 mice develop cerebral A $\beta$  deposits and spatial memory deficits in an age-dependent manner (Mullan et al., 1992). The tau<sup>vw</sup> line overexpresses three mutations linked to frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17; G272V, P301L and R406W) driven by the mouse Thy-1 promoter in a C57Bl6jxCBA hybrid background (Lim et al., 2001). Tau<sup>vw</sup> mice express human mutant tau at high levels in cortex and hippocampus with minimal expression in the spinal cord. Immunohistochemical analysis reveals high transgene expression in neuronal cell bodies and neurites in the cortex and the hippocampal formation. Ultrastructural analysis shows a pretangle appearance in neurons expressing mutant tau, with filaments of tau and increased numbers of lysosomes displaying aberrant morphology similar to those found in AD (Lim et al., 2001). Nine-, 16- and 25-month-old mice were used.

### Antibodies

The antibodies employed to detect tau in soluble or aggregated form were BR134 and 7.51, which is directed against the microtubule-binding region (Novak et al., 1991; a kind gift from Dr. Wischik, UK); antibodies reacting with phosphoresidues 181, 202, 262 and 422, were purchased from Calbiochem (Germany). Antibody AT8 was from Innogenetics (Belgium), this antibody recognizes phosphorylated tau at residue 202 (Goedert et al., 1995). Antibody 12E8 (Athena Laboratories), which recognizes tau phosphorylated at serine 262, was a kind gift from Dr. Seubert

tau levels in transgenic tau<sup>vw</sup> (21% $\pm$ 5) and in double transgenic APP<sup>sw</sup>/tau<sup>vw</sup> (23% $\pm$ 8) were observed, after measuring it by the reaction with ab 7.51; the tau phosphorylation data were normalized to the total (endogenous and exogenous) tau level in this panel and in panel D. (C) Tau from wt, transgenic APP<sup>sw</sup>, transgenic tau<sup>vw</sup> and double transgenic APP<sup>sw</sup>/tau<sup>vw</sup> was isolated from a cell brain extract and its reaction with ab 12E8 was measured as indicated above. (D) Quantitation of the results from (C). The age of the analyzed mice was 9 months old. Similar results were found for 16-month-old mice. In the lower panel (E) the amount of  $\alpha$ -tubulin used as a control for protein content is shown.

**Table 1.** Phosphorylation sites of tau in neurites surrounding amyloid plaques and in neurons in wild type mice (–/–), in APP<sup>sw</sup> (+/–), tau<sup>vlw</sup> (–/+), and double transgenic APP<sup>sw</sup>/tau<sup>vlw</sup> (+/+) 16-month-old mice

	–/–		+/–		–/+		+/+	
	Plaques	Neurons	Plaques	Neurons	Plaques	Neurons	Plaques	Neurons
Thr181	–	–	++	–	–	++	++	++
Ser202	–	–	+	–	–	++	+	++
Ser262	–	–	++	–	–	–	++	–
Ser396	–	–	–	–	–	–	–	–
Ser422	–	–	+	–	–	–	+	–
AT8	–	–	+	–	–	+	+	+

(Seubert et al., 1995). A monoclonal antibody directed against  $\alpha$ -tubulin (Sigma) was used as an internal control for protein quantity.

### Immunoblots analysis

Samples were run on 10% SDS-PAGE and electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell GmbH). The membrane was blocked by incubation with 5% semifat dried milk in PBS and 0.1% Tween 20, followed by 1-h incubation at room temperature with the primary antibody in PBS. Primary antibody dilutions were 7.51 (1/100), AT8 (1/100) and 12E8 (1/1000). After three washes, the membrane was incubated with a horseradish peroxidase-anti-rabbit or anti-mouse Ig conjugate (DAKO), followed by several washes in PBS-Tween 20. The membrane was then incubated for 1 min in Western Lightning reagents (PerkinElmer Life Sciences). The labeled protein was subjected to densitometric analysis for quantification. The optical density of the stained protein bands, in arbitrary units, was measured. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. To determine tau phosphorylation level (at different sites) using ab AT8 or ab 12E8, the data were normalized to the total tau levels determined by the interaction of tau protein with ab 7.51.

### Isolation of sarkosyl-insoluble tau aggregates

Preparation of sarkosyl-insoluble extracts from mouse brain of 16-month-old mice and electron microscopy of filaments was carried out as described previously (Greenberg and Davies, 1990). Rabbit anti-tau serum BR134 was used at a dilution of 1/30 for immunoelectron microscopy.

Ultrastructural analysis in frontal cortex and hippocampus were performed as indicated in Lim et al. (2001) in 25-month-old double transgenic mice and in single transgenic tau<sup>vlw</sup> mice.

### Immunohistochemistry

Serial consecutive sections, 30  $\mu$ m thick, were processed free-floating with the LSAB method (Dako LSAB+ kit) following the instructions of the supplier (Puig et al., 2004). Briefly, after blocking endogenous peroxidases, the sections were incubated with normal serum for 2 h and then incubated overnight at 4 °C with one of the primary antibodies. The phospho-specific tau Thr181 and tau Ser202, Ser262, Ser396 and Ser422 polyclonal antibodies were incubated at dilutions of 1:500 and 1:100, respectively. The antibody AT8 (direct against phosphoserines 199/202) was used at a dilution of 1/50. For A $\beta$  immunohistochemistry, a slight variation of the protocol was introduced. Before blocking endogenous peroxidases, sections were incubated with 98% formic acid for 3 min to enhance antigenicity. The  $\beta$  A<sub>1–40</sub> and  $\beta$  A<sub>1–42</sub> rabbit polyclonal antibodies (kindly provided by Dr. M. Sarasa, Zaragoza) were used at a dilution of 1:500. The phosphorylation-dependent anti-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) rabbit polyclonal an-

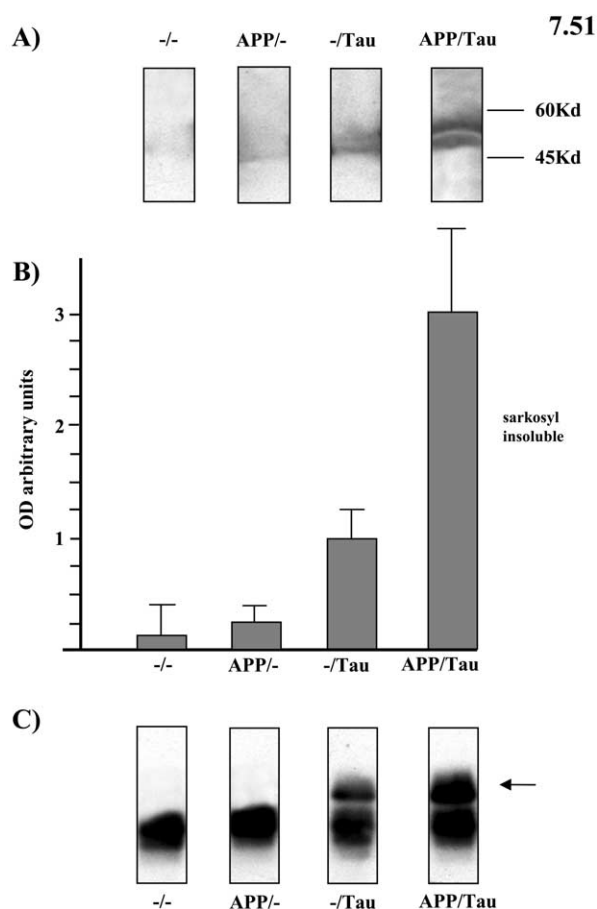
tibody (SAPK/JNK-P; Cell Signaling) was used at a dilution of 1:50. The phosphorylation-dependent rabbit polyclonal antibody to p-38 (Thr180/Tr182; p38-P; Calbiochem) was used at a dilution of 1:100. After washing, the sections were then incubated with link solution (LSAB) and with streptavidin–peroxidase solution for 15 min each at room temperature. The peroxidase reaction was then visualized, as a dark blue precipitate, with NH<sub>4</sub>NiSO<sub>4</sub> (0.05 M) in phosphate buffer (0.1 M), 0.05% diaminobenzidine, NH<sub>4</sub>Cl and 0.01% hydrogen peroxide. Blank sections stained only with the secondary antibodies were used as negative controls.

## RESULTS

### Tau phosphorylation in double transgenic mice

Control, transgenic APP<sup>sw</sup>, transgenic tau<sup>vlw</sup>, and double transgenic APP<sup>sw</sup>/tau<sup>vlw</sup> mice were analyzed. In this analysis, the phosphorylation of tau at one proline directed site, that recognized by antibody AT8, and at one non-proline directed site, that recognized by ab 12E8, were studied. Fig. 1A shows a slight increase in tau phosphorylation at the AT8 site in the different single APP<sup>sw</sup> and in the single tau<sup>vlw</sup> and double transgenic mice, compared with the control mouse, determined by Western blot, using equal amounts of protein (determined by the measurement of  $\alpha$ -tubulin content). Fig. 1B shows the quantitation of that Western blot. Also, in single transgenic tau<sup>vlw</sup> and in the double transgenic APP<sup>sw</sup>/tau<sup>vlw</sup> the presence of human tau (showing a lower mobility) can be found in phosphorylated form. When another antibody reacting with a PDP site, that reacting with serine 422, was tested, some differences were found among both the single and the double transgenic mice in the reaction with that antibody. In contrast, little, if any, reaction of tau protein was found in tau from wild type mice (Table 1).

Tau phosphorylation at one NPDP site was determined by the reaction with ab 12E8. In this case, a clear increase in tau phosphorylation was found when the control and the double transgenic APP<sup>sw</sup>/tau<sup>vlw</sup> mice were compared (Fig. 1C). Also, a slight increase in tau phosphorylation in transgenic APP<sup>sw</sup>, but less evident in transgenic tau<sup>vlw</sup>, was observed in different samples. The quantitation of the data is indicated in Fig. 1D. These results suggest that the presence of amyloid peptide may facilitate tau phosphorylation at this NPDP site. The age of the tested mice was 9 months. At this age it was previously shown a tau hy-



**Fig. 2.** Comparison of the formation of sarkosyl insoluble tau aggregates in samples from wild type and transgenic mice. (A) Sarkosyl insoluble aggregates were isolated as previously described (Greenberg and Davies, 1990) by centrifugation, and the presence of tau was characterized by WB using antibody 7.51. The different electrophoretic mobility for human tau transgene is shown by the arrow. Equal amounts of proteins from the different cell extracts were tested to isolate the sarkosyl insoluble tau aggregates. The electrophoretic mobility of MW markers is shown. (B) Quantitation of the results from (A). (C) Amount of total tau in the different samples was determined by the reaction with ab 7.51. The age of the analyzed mice was 16 months old.

perphosphorylation (AT8 site) in transgenic  $\tau^{\text{v}1\text{w}}$  (Lim et al., 2001).

### Sarkosyl insoluble tau aggregates

The formation of sarkosyl insoluble aggregates in the 16-month-old control, transgenic APP<sup>sw</sup>, transgenic  $\tau^{\text{v}1\text{w}}$  and double transgenic APP<sup>sw</sup>/ $\tau^{\text{v}1\text{w}}$  mice was analyzed by the isolation of brain cell extracts from the different sources, the addition of sarkosyl and centrifugation to isolate the sarkosyl insoluble tau aggregates (see Experimental Procedures). These aggregates were characterized by their isolation in centrifugation and by the reaction of pelleted tau with ab 7.51. Fig. 2A shows an increase in the amount of sarkosyl insoluble tau aggregates in the double transgenic APP<sup>sw</sup>/ $\tau^{\text{v}1\text{w}}$  mouse. As indicated in the Figure, not only endogenous

mouse tau but also the mutated human tau, showing a slower electrophoretic mobility, is present in those aggregates. The quantitation of that tau aggregation is indicated in Fig. 2B. Taking the same amount of total tau protein determined by Western blot (Fig. 2C) before carrying out the isolation of sarkosyl insoluble tau aggregates performed the quantitation of the previous data. A difference between the aggregates from  $\tau^{\text{v}1\text{w}}$  mouse and the double transgenic APP<sup>sw</sup>/ $\tau^{\text{v}1\text{w}}$  is that in the latter case, but not in the former, tau was phosphorylated at Ser 262 and Ser 422, as determined by Western blot (not shown). Another difference is the morphology of tau aggregates (see below).

The assembly of tau protein in the sarkosyl insoluble tau aggregates was further identified by electron microscopy. Mainly amorphous aggregates were found although Fig. 3 (A, B) shows the presence of some filamentous polymerized structures of about 10 nm that can react with tau antibodies from the double transgenic mouse. However, in the case of  $\tau^{\text{v}1\text{w}}$ , the diameter of the isolated filamentous structures was much lower (about 2 nm; see Fig. 3C), as previously indicated (Lim et al., 2001).

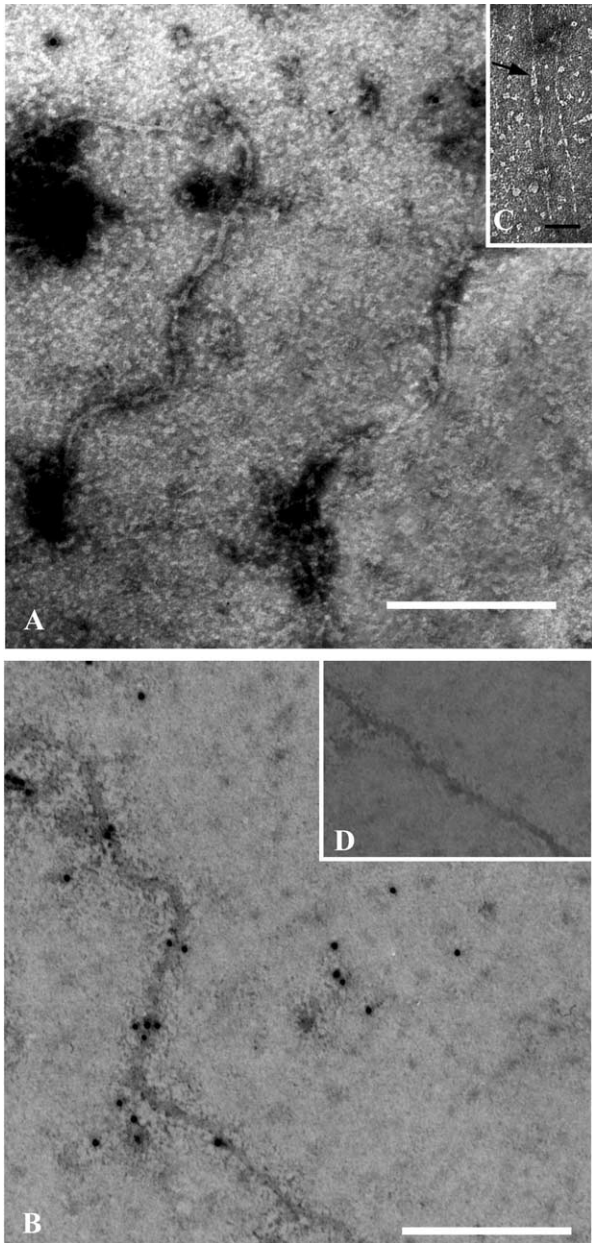
Additionally, in double APP-tau transgenic mice ultrastructural studies were carried out on those AT8-immunoreactive neurons and processes surrounding amyloid deposits. In some AT8-positive processes a huge degeneration, but no filaments, was found (Fig. 4, inset left). However, in some AT8-positive healthy appearing neurons, filaments were found at the apical dendrite as well as in some areas of the neuronal soma (Fig. 4A, B). In addition, numerous AT8-negative degenerating processes were observed surrounding the amyloid deposits (not shown).

### Localization of A $\beta$ aggregates and tau in hyperphosphorylated form

Amyloid aggregates stained with antibodies to  $\beta\text{A}_{1-40}$  and  $\beta\text{A}_{1-42}$  were present in the hippocampus, amygdala and cerebral cortex in the APP and double APP-tau transgenic mice (Fig. 5). Occasional plaques were also observed in the subcortical white matter. No plaques were seen in tau transgenic and age-matched control mice. Phosphorylation-dependent tau antibodies Thr181, Ser202 (AT8), Ser262 (12E8) and Ser422 disclosed abnormal neurites containing hyperphosphorylated tau in the vicinity of the amyloid plaques in APP<sup>sw</sup> mice, as previously reported. Abnormal neurites were not recognized with antibodies to phospho-tauSer396. In contrast to neurites, neuronal somas containing phospho-tau in tau transgenic mice were stained only with phospho-tau antibodies Thr181 and Ser202, but not with antibodies Ser262, Ser396 and Ser422. These differences in tau phosphorylation sites between neurites and neuronal somas were reproduced in double APP<sup>sw</sup>/ $\tau^{\text{v}1\text{w}}$  transgenic mice (Figs. 6 and 7; Table 1).

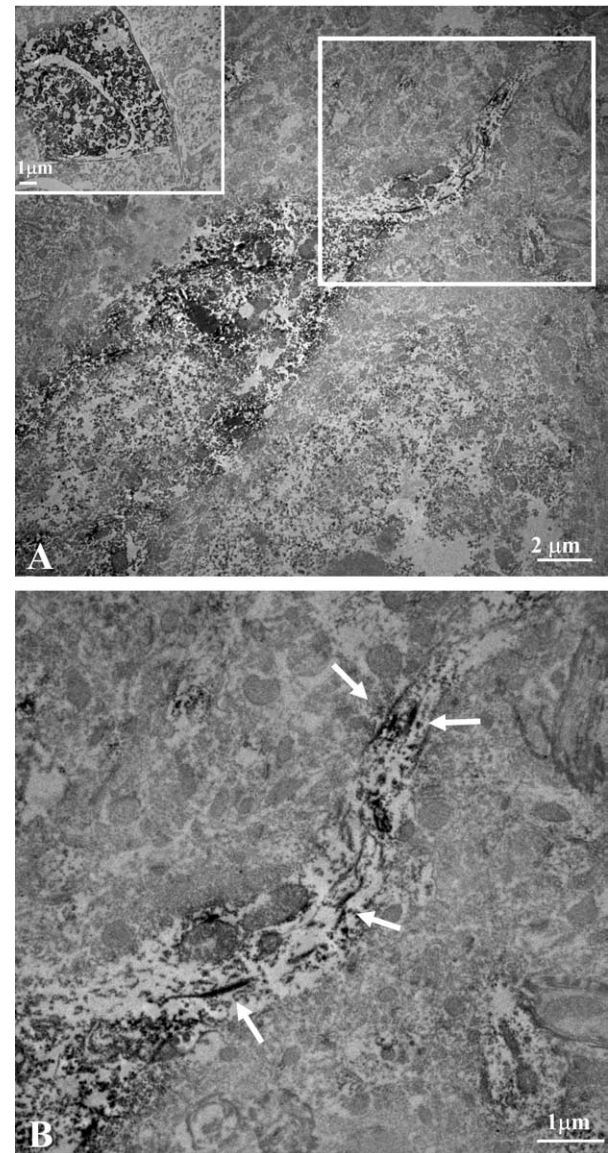
Interestingly, aged (25-month-old) double transgenic mice disclosed particular immunohistochemical features. In addition to fine punctuate tau-immunoreactive pro-





**Fig. 3.** Tau filaments in sarkosyl insoluble aggregates. The presence of tau filaments in double transgenic mice was tested in sarkosyl insoluble aggregates by electron microscopy (around 10 nm; A) and immunoelectron microscopy (B). The diameter of these aggregates is much higher than that of the filaments assembled in single tau transgenic mice (around 2 nm; C). Scale bar=200 nm in A and in B and 100 nm in C. (D) No immunogold labeling was found in the absence of added tau antibody.

cesses, varicose and coarse neurites were found surrounding many amyloid deposits. Moreover, very strong AT8-immunoreactive neurons were seen in the entorhinal cortex, perirhinal fissure and, rarely, the isocortex and CA1 sector of the hippocampus (Fig. 7). These results suggest that the presence of A $\beta$  aggregates may facilitate not only the tau phosphorylation at a non-proline directed site like serine 262, but also that at serine 202.

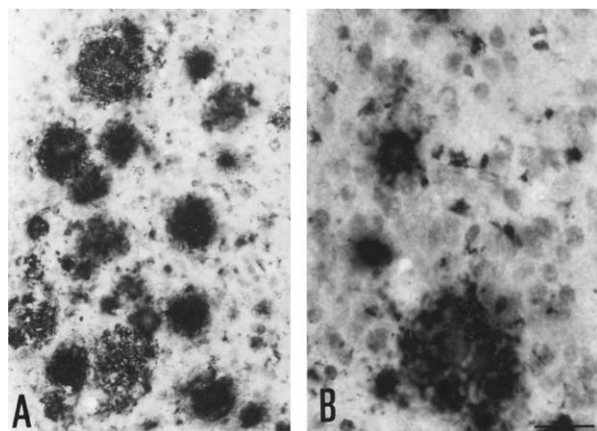


**Fig. 4.** Tau filaments in neurons of the double transgenic mice. (A) Electron microscopy of an AT8-immunoreactive neuron showing some filaments immunolabeled with this antibody. Inset at the left shows a clear degenerating process of another neuron showing AT8 immunoreactivity but without filaments. The white rectangle frames the apical dendrite enlarged in (B). White arrows point to filaments immunostained with AT8 in the cerebral cortex of a double transgenic mouse of 25 months. Calibration bars are indicated in each figure.

#### Colocalization of some tau kinases with tau aggregates

It has been already suggested a role for GSK3, in the tau modification observed in tau vlw (Pérez et al., 2003). Thus, we have tested for other additional kinases that may play a role in such modification using as criteria their colocalization with tau aggregates. These kinases are two members of MAPkinase family: SAPK/JNK-P and p38-P.

Sections stained with antibodies to SAPK/JNK-P and p38-P permitted the study of the expression of phosphorylated (presumably active) kinases in double transgenic

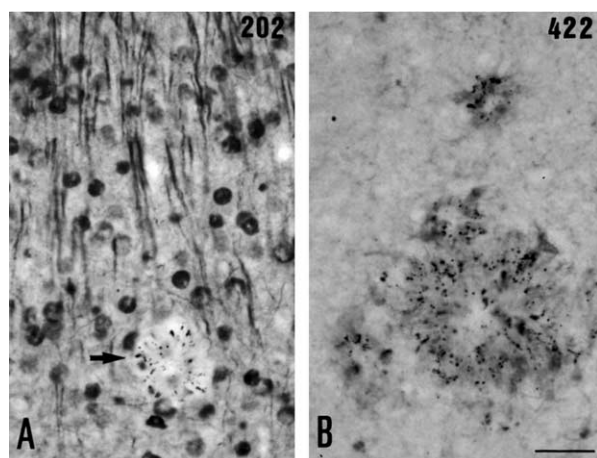


**Fig. 5.** A $\beta$  deposits in transgenic APP<sup>sw</sup> mouse. Nine-month-old transgenic APP<sup>sw</sup> mice develop A $\beta$  deposits; scale bar=25  $\mu$ m.

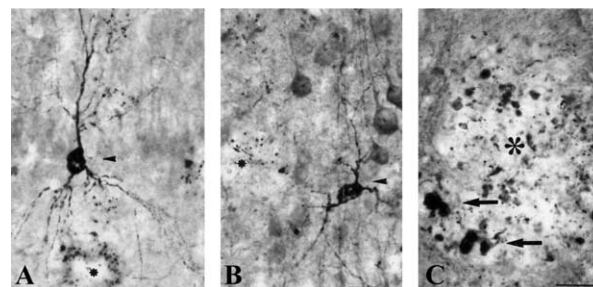
mice. Strong stress kinase immunoreactivity p38-P and SAPK/JNK-P immunoreactivity (Fig. 8A and C, respectively) was found surrounding cores of amyloid plaques. Consecutive sections disclosed SAPK/JNK-P and p38-P immunoreactivity in the majority of, if not all amyloid plaques. In contrast, p38-P immunoreactivity was seen in a small number of neurons in the entorhinal cortex (Fig. 8B) whereas SAPK/JNK-P was extremely rare, in similar neurons of the entorhinal cortex (Fig. 8D). No SAPK/JNK-P p38-P immunoreactivity was seen in controls (data not shown).

## DISCUSSION

Although a detailed study of kinases involved in tau phosphorylation in double transgenic mice is out of the scope of the present work, preliminary studies have shown stress



**Fig. 6.** Immunohistochemistry to tau phosphorylation sites Ser202 and Ser422 in the hippocampus of APP/tau double transgenic mice showing differences in tau phosphorylation in neurites surrounding amyloid plaques and in neurons. The antibody Ser202 (or AT8) stains phospho-tau in neurons and neurites surrounding amyloid plaques (arrow), whereas the antibody Ser422 recognizes only neurites surrounding amyloid plaques but not neurons. Cryostat sections with no hematoxylin counterstaining; scale bar=25  $\mu$ m.



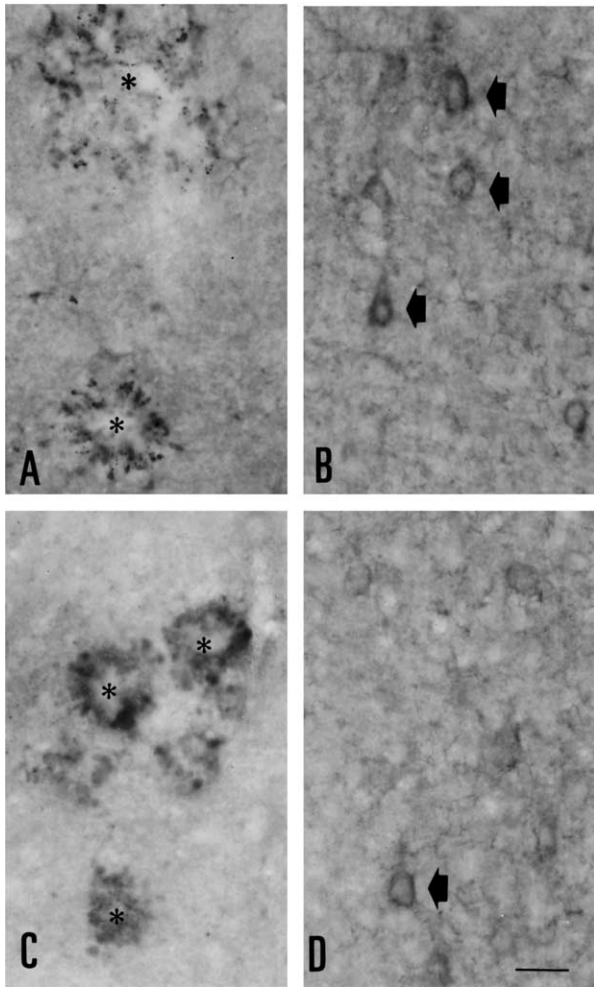
**Fig. 7.** Immunohistochemistry to tau phosphorylation site Ser202 in APP/tau double transgenic mice. AT8 immunohistochemistry shows strong immunoreactivity in coarse and varicose neurites (arrowheads) surrounding amyloid plaques and in neurons of the entorhinal cortex and hippocampus in 25 months APP<sup>sw</sup>/tau<sup>vw</sup> transgenic mice (A–C). Cryostat sections with no hematoxylin counterstaining; scale bar=25  $\mu$ m.

kinase expression SAPK/JNK and p38-P surrounding amyloid plaques. Since the antibodies were directed to specific phosphorylation sites that activate stress kinases, the present results suggest activation of stress kinases as putative mediators of tau phosphorylation of neurites surrounding amyloid plaques. Similar findings have been reported for amyloid plaques in the single APP mutant (Puig et al., 2004). In contrast, active stress kinases were rarely encountered in neuronal bodies of target areas thus suggesting a discrete participation of stress kinases in the abnormal tau phosphorylation of neurons.

The possible effect of amyloid peptide aggregates on tau phosphorylation and aggregation has been analyzed by comparing these features in three different mice: one expressing a mutated form of APP, which overexpress  $\beta$  amyloid; a second one expressing a mutated form of tau protein that could result in the formation of tau polymers; and the double transgenic mouse that is generated after crossing the first two. In the APP transgenic mouse, an increase in the phosphorylation of a non-proline directed site was found, suggesting a role for amyloid peptide in this phosphorylation. Additionally, a slight increase, compared with the control mouse, was found in the APP transgenic mouse for a proline directed site, like that recognized by AT8, and, more evidently, in that site recognized by antibody 422, whose phosphorylation may be induced by A $\beta$  (Ferrari et al., 2003).

In the tau transgenic mouse, as previously described (Lim et al., 2001), an increase in the phosphorylation at proline directed sites was observed at 9-month-old mice, and this increase can be correlated with the presence of aberrant tau aggregates, as also previously described (Lim et al., 2001). For the tau transgenic mouse the increased phosphorylation of that protein could be due mainly to an inhibition of phosphatase PP2A, as previously indicated (Gong et al., 1993; Goedert et al., 2000). On the other hand, the main phosphorylation could be due, at least in part to the action of GSK3 protein (Pérez et al., 2002, 2003). In the double transgenic mice, a main role for non-proline direct phosphorylation has been described (Santa-Maria et al., 2004). The consequence of that non-proline directed sites phosphorylated kinases in the double





**Fig. 8.** p38-P (A, B) and SAP/JNK-P (C, D) immunoreactivity in double transgenic mice. p38-P and SAPK/JNK-P is observed surrounding cores of amyloid plaques (A, C, asterisks). p38-P immunoreactivity (C) is found in a few neurons of the entorhinal cortex, whereas SAPK/JNK-P immunoreactivity is rarely present, but for very isolated neurons, in double transgenic mice. Cryostat sections processed free-floating without counterstaining; scale bar=25  $\mu$ m.

transgenic mice correlates with an increase in tau aggregates that could be assembled by a possible mechanism different from those found in tau<sup>vlw</sup>. In this way, differences in the diameter of the filaments assembled in single (around 2 nm) and in double (around 10 nm) transgenic mice were observed. It is not known if the 2 nm filaments could be the precursors that facilitate the assembly of the 10 nm tau filaments.

Taking together our results we can suggest that in our double transgenic mouse two different, and independent, types of tau phosphorylation could occur. In one type amyloid peptide could facilitate non-proline directed phosphorylation. It is known that  $\beta$  amyloid pathology is evident at 6–8 months in APP<sup>sw</sup> mice, and it could proceed to tau phosphorylation. Also, tau phosphorylation could occur at other different sites, independently of the presence of A $\beta$ . This type of phosphorylation is mainly a proline directed modification. In the first type, it is likely that a mimicking of

the effect postulate in the amyloid cascade hypothesis (Selkoe, 1989; Hardy and Selkoe, 2002) occurs, whereas in the other case, the effect could be that occurring in other type of tauopathies, such as FTDP-17, in which the A $\beta$  is absent.

The immunohistochemical analysis described in this work supports the earlier hypothesis, since in those places where amyloid deposits are present, an increase in the phosphorylation at non-proline directed sites of tau protein is found, whereas at those places where no amyloid plaques were found, only tau phosphorylation at proline direct sites was observed. When amyloid peptide is present, a new phosphorylation at the non-proline directed site, identified by ab 12E8, occurs. In the tau transgenic mouse, in which amyloid peptide is not present, only an increase in proline directed sites occurs.

Additionally, our data partially concur with the data of Gotz et al., 2001, and Lewis et al., 2001, since we found an increase in tau aggregates when amyloid peptide is present, and our data further suggest a mechanism for such increase based on the phosphorylation of tau at its tubulin-binding region. This may result in an increase of tau that is not bound to microtubules and which, therefore, could have a greater capacity for self-assembly into polymers.

In contrast to this, tau phosphorylation at Ser 422, which does not occur in the wild type mouse, takes place in the APP<sup>sw</sup> transgenic mouse, and this phosphorylation could be related to the toxic effects of A $\beta$  (Ferrari et al., 2003). This phosphorylation at serine 422 (that could be mediated by a member of MAP kinase family; Morishima-Kawashima et al., 1995) does not occur in the tau<sup>vlw</sup> transgenic mouse where aberrant 2 nm tau filaments are found, although recently Ferrari et al. (2003) have related this type of phosphorylation with tau aberrant polymerization into 10 nm tau filaments.

Finally, serine 422 is also phosphorylated in the double transgenic mouse, probably as a consequence of the modification found in APP<sup>sw</sup> transgenic mice.

In summary, our results suggest a role for A $\beta$  in facilitating the phosphorylation of tau at NPDP sites and in a slight increase in the amount of sarkosyl-insoluble tau polymers. The relation between these two features has recently been analyzed (Santa-Maria et al., 2004). Also, our results indicate that tau phosphorylation precedes its assembly and it is compatible with a correlation between those features (Pérez et al., 2003; Alonso et al., 2001).

Additionally, these results also support the data indicating that injections of fibrillar A $\beta$  in the cortex of monkey result in tau phosphorylation at serine 262 (Geula et al., 1998). Also, they are consistent with the fact that in models for tauopathies like that for FTDP-17 (Lim et al., 2001), fibrillar tau polymers can be assembled in the absence of phosphorylation of ser 262, but when an overexpression of A $\beta$  takes place, that residue is modified and an increase of tau polymers is found, as shown in this work. Thus, amyloid peptide could facilitate tau polymerization.

However, it has been shown that soluble amyloid  $\beta$ -protein is increased in frontotemporal dementia with

tau gene mutations (Vitali et al., 2004) and that intra-neuronal amyloid peptide could accumulate in the endosomal-lysosomal vesicles (Planel et al., 2004), which are affected in the transgenic tau<sup>wt</sup> mice (Lim et al., 2001). Preliminary experimentation suggests that in the double transgenic mice there is an increased amyloid protein aggregation compared with that for single APP transgenic mice (Ribé et al., unpublished observations). In this way, not only can amyloid peptide facilitate tau polymerization; in addition, the expression of tau<sup>wt</sup> may promote amyloid aggregation.

**Acknowledgments**—This work was supported in part by FIS grants P1020004; C04-006 and G04-167 to IF; European Commission Grant DIADEM QLRT-2000-02362 to TG; and CICYT, C04-006, G04-167, NeuroPharma and Lilly Foundation grants to J.A.

## REFERENCES

- Allen B, Ingram E, Takao M, Smith MJ, Jakes R, Virdee K, Yoshida H, Holzer M, Craxton M, Emson PC, Atzori C, Migheli A, Crowther RA, Ghetti B, Spillantini MG, Goedert M (2002) Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci* 22:9340–9351.
- Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2001) Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6923–6928.
- Alzheimer A (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Z Psychiatr Psych Gerichl Med* 64:146–148.
- Boutajangout A, Authélet M, Blanchard V, Touchet N, Tremp G, Pradier L, Brion JP (2004) Characterisation of cytoskeletal abnormalities in mice transgenic for wild-type human tau and familial Alzheimer's disease mutants of APP and presenilin-1. *Neurobiol Dis* 15:47–60.
- Brion JP, Tremp G, Octave JN (1999) Transgenic expression of the shortest human tau affects its compartmentalization and its phosphorylation as in the pretangle stage of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 154:255–270.
- Ferrari A, Hoernndli F, Baechi T, Nitsch RM, Gotz J (2003) beta-Amyloid induces paired helical filament-like tau filaments in tissue culture. *J Biol Chem* 278:40162–40168.
- Ferrer I, Boada Rovira M, Sanchez Guerra ML, Rey MJ, Costa-Jussa F (2004) Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 14:11–20.
- Geula C, Wu CK, Saroff D, Lorenzo A, Yuan M, Yankner BA (1998) Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat Med* 4:827–831.
- Glennier GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* 122:1131–1135.
- Goedert M, Jakes R, Vanmechelen E (1995) Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci Lett* 189:167–169.
- Goedert M, Satumira S, Jakes R, Smith MJ, Kamibayashi C, White CL 3rd, Sontag E (2000) Reduced binding of protein phosphatase 2A to tau protein with frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 mutations. *J Neurochem* 75:2155–2162.
- Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1993) Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 61:921–927.
- Gotz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM (2001) Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* 293:1491–1495.
- Greenberg SG, Davies P (1990) A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5827–5831.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4913–4917.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353–356.
- Ishihara T, Hong M, Zhang B, Nakagawa Y, Lee MK, Trojanowski JQ, Lee VM (1999) Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron* 24:751–762.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E (2001) Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293:1487–1491.
- Lim F, Hernandez F, Lucas JJ, Gomez-Ramos P, Moran MA, Avila J (2001) FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and Tau filaments in forebrain. *Mol Cell Neurosci* 18:702–714.
- Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Titani K, Ihara Y (1995) Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem* 270:823–829.
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1:345–347.
- Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO (2003) Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med* 9:448–452.
- Novak M, Jakes R, Edwards PC, Milstein C, Wischik CM (1991) Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 7.51. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5837–5841.
- Pérez M, Hernandez F, Gomez-Ramos A, Smith M, Perry G, Avila J (2002) Formation of aberrant phosphotau fibrillar polymers in neural cultured cells. *Eur J Biochem* 269:1484–1489.
- Pérez M, Hernandez F, Lim F, Diaz-Nido J, Avila J (2003) Chronic lithium treatment decreases mutant tau protein aggregation in a transgenic mouse model. *J Alzheimers Dis* 5:301–308.
- Planel E, Miyasaka T, Laune T, Chui DH, Tanemura K, Sato S, Murayama O, Ishiguro K, Tatebayashi Y, Takashima A (2004) Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24:2401–2411.
- Probst A, Gotz J, Wiederhold KH, Tolnay M, Mistl C, Jaton AL, Hong M, Ishihara T, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Crowther RA, Spillantini MG, Burki K, Goedert M (2000) Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein. *Acta Neuropathol (Berl)* 99:469–481.
- Puig B, Gómez-Isla T, Ribé E, Cuadrado M, Torrejón Escribano B, Dalfó E, Ferrer I (2004) Expression of stress-activated kinases c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK-P) and p38 kinase (p38-P), and tau hyperphosphorylation in neurites surrounding A plaques in APPTg2576 mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* 3065:499–502.
- Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A (2002) Tau is essential to beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6364–6369.
- Santa-Maria I, Hernandez F, Martin CP, Avila J, Moreno FJ (2004) Quinones facilitate the self-assembly of the phosphorylated tubulin

- binding region of tau into fibrillar polymers. *Biochemistry* 43:2888–2897.
- Selkoe DJ (1989) The deposition of amyloid proteins in the aging mammalian brain: implications for Alzheimer's disease. *Ann Med* 21:73–76.
- Seubert P, Mawal-Dewan M, Barbour R, Jakes R, Goedert M, Johnson GV, Litsky JM, Schenk D, Lieberburg I, Trojanowski JQ, et al. (1995) Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J Biol Chem* 270:18917–18922.
- Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B (1998) Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7737–7741.
- Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Bruynseels K, Vandezande K, Laenen I, Geerts H, Mercken M, Sciot R, Van Lommel A, Loos R, Van Leuven F (1999) Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am J Pathol* 155:2153–2165.
- Tanemura K, Murayama M, Akagi T, Hashikawa T, Tominaga T, Ichikawa M, Yamaguchi H, Takashima A (2002) Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau. *J Neurosci* 22:133–141.
- Tatebayashi Y, Miyasaka T, Chui DH, Akagi T, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanemura K, Murayama M, Ishiguro K, Planel E, Sato S, Hashikawa T, Takashima A (2002) Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13896–13901.
- Vitali A, Piccini A, Borghi R, Fornaro P, Siedlak SL, Smith MA, Gambetti P, Ghetti B, Tabaton M (2004) Soluble amyloid beta-protein is increased in frontotemporal dementia with tau gene mutations. *J Alzheimers Dis* 6:45–51.
- Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, Van Bronswijk W, Martins R (2002) Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci* 22:RC221.

(Accepted 13 September 2004)  
(Available online 11 November 2004)



# Acetylcholine Receptors and Tau Phosphorylation

A. Rubio, M. Pérez and J. Ávila\*

*Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain*

**Abstract:** Alzheimer's disease (AD) is characterized by the presence, in the brain of the patients, of two aberrant structures: intracellular neurofibrillary tangles (NFTs), containing an abnormal hyperphosphorylated form of tau protein, and extracellular senile plaques (SPs), mainly composed by fibrillar amyloid peptide. Another feature of AD is the neurodegeneration and dysfunction of basal forebrain cholinergic system. A possible connection among those AD characteristics could occur. Thus, the purpose of this short review is to summarize the involvement of nicotinic (nAChR) and muscarinic (mAChR) receptors on tau phosphorylation, in a direct way, or through the previous interaction of some of these receptors with amyloid . Several studies have demonstrated that nAChR activation results in a significantly increase of tau phosphorylation, whereas mAChR activation, may prevent tau phosphorylation.

**Keywords:** Alzheimer's disease, tau phosphorylation, amyloid peptide, nicotinic receptors, muscarinic receptors, acetylcholine.

## INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a senile dementia characterized by a progressive loss of memory together with cognitive and behavioural impairments. Neuropathologic hallmarks of AD include intracellular neurofibrillary tangles (NFTs) and senile plaques (SPs) [1].

NFTs are composed by paired helical filaments (PHF), containing an abnormal hyperphosphorylated form of the microtubule-associated protein, tau (for a review see [2]). The modification of tau by phosphorylation affects its interaction with microtubules and facilitates tau assembly into PHF [3]. Tau phosphorylation depends on the balance of kinases and phosphatases activities [4,5]. In the brain of an AD patient, NFTs are particularly abundant in the entorhinal cortex, the hippocampus and the association cortices. The number of cortical NFTs correlates positively with the severity of dementia [6].

SPs are extracellular lesions composed primarily by a core of fibrillar amyloid peptide surrounded by reactive astrocytes, microglial cells and dystrophic neurites. The major amyloid peptides in the plaques are amyloid (1-42) and amyloid (1-40). These peptides are generated by proteolytic cleavage of the amyloid precursor protein (APP). There are two distinct -secretase or -secretase pathways. Cleavage of APP by and -secretase prevents amyloid formation, whereas and -secretase route leads to a soluble APP and amyloid (for a review see [7]).

Another feature of AD is the neurodegeneration and dysfunction of basal forebrain cholinergic system. Long time ago, biochemical investigations indicated that the disease was associated with a loss of acetylcholine in the cerebral cortex [8,9] and, afterwards, it was indicated that the severity of dementia was correlated with the extent of the cholinergic loss [10] and the reduction in the activity of choline acetyltransferase in the cortex [11]. In addition, the involvement of cholinergic system in AD was also supported by the use of inhibitors of acetylcholinesterase (such as tacrine, rivastigmine, donepezil and galantamine) for the treatment of the disease [12].

Acetylcholine is implicated in different cognitive functions such as learning and memory [13]. Once released, acetylcholine can bind to two distinct receptors subtypes: nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) and muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs). Although nAChRs are ionotropic receptors, mAChRs are metabotropic. nAChRs are ligand-gated ion channels with a pentameric structure formed by a combination of five different subunits ( , , , and ) (for a review see [14]). Each channel can be homomeric or heteromeric, when they are respectively formed by the same subunit or different subunits combined. The 7 and 4 2 nAChRs subtypes are involved in the pathogenesis of AD since they are the most abundant subtypes in brain regions affected by this dementia [15, 16]. mAChRs are divided in five subtypes (M1-M5), and all of them are present in the CNS [17, 18]. Among the five different subtypes of mAChRs, the M1 mAChR, highly expressed in the cerebral cortex and the hippocampus, seems to be specifically implicated in memory processes relevant to AD [19].

\*Address correspondence to this author at the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma, 28049, Cantoblanco, Madrid, Spain; Tel: 913975070; Fax: 913974799; E-mail: javila@cblm.uam.es

Since the molecular mechanism by which cholinergic neurons dystrophy occurs is unclear and taking into account the probable neurotoxicity of amyloid peptide and hyperphosphorylated tau, this short review will present the involvement of nAChR and mAChR on tau phosphorylation in a direct way or through the previous interaction with amyloid .

## NICOTINIC RECEPTORS AND TAUPROTEIN PHOSPHORYLATION

A selective loss of nAChRs in the cortex and the hippocampus of AD brains had been extensively studied using different techniques: by immunohistochemistry and western-blot analysis [16, 20, 21], by quantifying the binding of specific radiolabeled ligands [22, 23, 24] or by positron emission tomography (PET) [25]. This consistent result suggests a potential relationship between nAChRs and AD neuropathology.

Nevertheless, few data are available about the effects of nAChR activation and tau pathology (revised in [26]) (Table 1). Treatments with nicotine and epibatidine in SH-SY5Y human neuroblastoma cells increased the levels of phosphorylated tau recognized by AT8 and AT270 antibodies and decreased those of nonphosphorylated tau recognized by tau1 antibody [27]. This increase in tau phosphorylation was prevented when the antagonists D-tubocurarine and mecamylamine were added, but failed to block the effect of

nicotine or epibatidine on up-regulation of nicotinic receptors. In addition, since several cholinesterase inhibitors have been shown to interact with an allosteric site on the nicotinic receptors different from that for acetylcholine [28-30], the effect of cholinesterase inhibitors on tau phosphorylation was also studied. Similar to nicotine, treatments with tacrine, donepezil and galantamine all increased the levels of phosphorylated tau [27]. Wang *et al.* [31] showed that nicotine and epibatidine stimulate transient tau phosphorylation at three proline-directed sites (Ser202, Thr181 and Thr231) in SK-N-MC human neuroblastoma cells. So, both *in vitro* studies demonstrate that nicotinic receptor activation increases tau phosphorylation. Consistently, using SH-SY5Y human neuroblastoma cells, we found that nicotine treatments increased tau phosphorylation at Ser 262 site (A. R. unpublished data).

Interestingly, a possible association between smoking and the number of NFTs has been investigated in different post-mortem studies. In one hand, a positive correlation was found in men brains between NFTs and the amount smoked [32]. In contrast, neuropathologic data from the Honolulu Heart Program supported that the effects of smoking are specific for plaque more than NFTs. In this case, the number of neuritic plaques increased with the number of cigarettes consumed [33].

Moreover, recent findings indicated that chronic nicotine treatment exacerbates tau pathology *in vivo*

**Table 1. Effect of Different Treatments on Tau Phosphorylation**

	Experimental models	Treatments	Tau phosphorylation (sites)	References
<b>nAChR agonists</b>	SH-SY5Y cells	Nicotine and Epibatidine	Increase (AT8, AT270)	Hellström-Lindahl <i>et al.</i> 2000 [27]
	SH-SY5Y cells	Tacrine, Donepezil, Galantamine	Increase (AT8, AT270)	Hellström-Lindahl <i>et al.</i> 2000 [27]
	SK-N-MC cells	Nicotine and Epibatidine	Increase (Ser202, Thr181, Thr231)	Wang <i>et al.</i> 2003 [31]
	APP/tau mice	Nicotine	Increase (AT8, AT270)	Oddo <i>et al.</i> 2005 [34]
<b>mAChR agonists</b>	M1 transfected PC12 cells	Carbachol and AF102B	Decrease (AT8, PHF1)	Sadot <i>et al.</i> 1996 [46]
	M1 transfected CHO cells	M1 agonists	Decrease (AT8, tau1)	Forlenza <i>et al.</i> 2000 [47]
	Cortical neurons	Carbachol	Decrease (AT8, tau1)	Forlenza <i>et al.</i> 2000 [47]
	ApoE deficient mice	AF150 (S)	Decrease (AT8, AT270, SMI32, 37, 34, P262-7)	Genis <i>et al.</i> 1999 [48]
	APP/tau mice	AF267B	Decrease (AT8)	Caccamo <i>et al.</i> 2006 [50]
<b>Amyloid <math>\beta</math></b>	Cultured neurons	Amyloid fibrils	Increase (Ser202, Ser396/ Ser404)	Busciglio <i>et al.</i> 1995 [69]
	Hippocampal neurons	Amyloid (25-35)	increase	Takashima <i>et al.</i> 1996 [70]
	SH-SY5Y cells	Amyloid (25-35)	Increase (PHF1)	Shea <i>et al.</i> 1997 [71]
	SN56 cells	Amyloid (1-40)	Increase (AT8, PHF1)	Le <i>et al.</i> 1997 [72]
	SK-N-MC cells	Amyloid (1-42)	Increase (Ser202, Thr181, Thr231)	Wang <i>et al.</i> 2003 [31]
	Hippocampal synaptosomes	Amyloid (1-42)	Increase (Ser202, Thr181, Thr231)	Wang <i>et al.</i> 2003 [31]

[34]. A transgenic model of AD (3xTg-AD) expresses human APP with Swedish mutations and tau protein bearing P301L mutation. The aged 3xTg-AD mice present amyloid plaques and tangles and progressive deficits in cognition and LTP [35-37]. Nicotine administration to 3xTg-AD and nonTg mice induces an up-regulation of nAChRs [34]. This finding was consistent with previous reports showing that the density of nAChR in human brain is increased in smokers probably by the nicotine present in the tobacco smoke [38, 39]. In addition, chronic nicotine treatment to 3xTg-AD mice increases tau aggregation and tau phosphorylation at the sites recognized by AT8 and AT270 antibodies [34].

The exact molecular mechanism by which nicotinic receptor activation leads to changes in tau phosphorylation remains unclear. Nicotinic receptors are permeable for  $\text{Ca}^{2+}$  and the consequent increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  can activate different specific signalling cascades (reviewed in [40]). Many  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent kinases are known to phosphorylate tau *in vivo* such as cdk5, ERK1, ERK2, GSK3 and p38-MAP kinases and could be responsible for tau phosphorylation-induced by nicotinic activation. Oddo *et al.* demonstrated that the activation of p38-MAP kinase seemed to cause the increase in tau phosphorylation due to the chronic nicotine intake in 3xTg-AD transgenic mice [34].

## MUSCARINIC RECEPTORS AND TAU PROTEIN PHOSPHORYLATION

Although most studies suggest that the mAChR density is not altered between AD and control brains [41, 42], functional studies of muscarinic M<sub>1</sub> receptor-mediated signal transduction have shown a loss of receptor-G protein coupling [43, 44]. Since the M<sub>1</sub> subtype seems to be the most relevant in AD pathology, most of the studies presented to evaluate the relationship between mAChRs and tau phosphorylation are focused on this receptor. In summary, activation of M<sub>1</sub> mAChR decreases tau protein phosphorylation suggesting that the decreased cholinergic activity associated with AD could contribute to a destabilization of the microtubule network (revised in [45]). A stimulation of PC12 cells, stably transfected with the cDNA encoding M<sub>1</sub> mAChR, with two acetylcholine agonists, carbachol and AF102B, results in a decrease of tau phosphorylation, as indicated by the reaction of tau with two specific phosphotau antibodies, AT8 and PHF1 [46]. The muscarinic effect was both time and dose dependent, and was blocked by atropine. Some work has been done later to understand the mechanism of action of muscarinic agonists on tau phosphorylation. In non-neuronal cells expressing the M<sub>1</sub> mAChR, a range of M<sub>1</sub> agonists reduced transiently-expressed tau phosphorylation, *via* GSK-3 inhibition [47]. This inhibition could be due to protein kinase C (PKC) activation, itself activated following muscarinic signalling. The reduction on tau

phosphorylation at sites recognized by AT8 and tau1 antibodies was also demonstrated in primary cortical cultures treated with carbachol [47]. Furthermore, it was shown that prolonged treatments of apolipoprotein E (apoE)-deficient mice with the M<sub>1</sub> mAChR agonist AF150(S) reduces the hyperphosphorylation of tau protein associated with these mice and localized N-terminally to the microtubule binding domain of tau protein [48]. In addition, exposure of these mice to AF150(S) abolished their memory deficits and resulted in recovery of their brain cholinergic markers [49]. Moreover, our muscarine treatments in SH-SY5Y human neuroblastoma cells decreases tau phosphorylation at Ser 262 site (A. R. unpublished data). Thus, activation of M<sub>1</sub> mAChR might provide a novel treatment strategy for AD due to its beneficial effect on tau phosphorylation (Table 1).

Interestingly, the therapeutic potential of selective M<sub>1</sub> mAChR agonists has been recently supported by *in vivo* studies. Caccamo *et al.* [50] investigated whether the selective M<sub>1</sub> muscarinic agonist AF267B can affect AD pathologies. 6-months old 3xTg-AD mice were treated chronically with AF267B. AF267B intake by transgenic mice reduces tau phosphorylation in the cortex and the hippocampus, as indicated by AT8 antibody. In contrast, the onset of tau pathology was accelerated in 3xTg-AD mice treated with dicyclomine, an M<sub>1</sub> antagonist. In this case, tau phosphorylation was significantly increased in the hippocampus using the AT8 antibody. Tau phosphorylation was also detected in the cortex and the amygdala using AT8 and PHF1 antibodies, whereas no PHF1 or AT8-positive neurons were detected at this age in these brain regions in untreated-3xTg-AD. In agreement with previous *in vitro* studies [47], this work concluded that the decrease in tau phosphorylation induced by AF267B was mediated by the reduction of GSK3 activity.

## AMYLOID $\beta$ AND CHOLINERGIC RECEPTORS

### Nicotinic Receptors

Different *in vitro* analysis reported that nicotine has anti-amyloidogenic effects. Based on circular dichroism and spectroscopic studies, nicotine seems to inhibit amyloid fibril formation from amyloid peptide [51, 52]. In addition, Ono *et al.* confirmed that the inhibition of amyloid fibril formation by nicotine was dose dependent and that nicotine disrupted preformed amyloid fibrils [53]. Zeng *et al.* suggested that nicotine inhibits amyloid fibrils formation by binding to a soluble sheet aggregate [52]. The effect of nicotine could be also attributed to N-methylpyrrolidine moieties of nicotine [53].

Several studies have reported the effect of nicotine on APP processing. Nicotine treatment to PC12 cells, that constitutively express APP and nAChRs [54], increased the release of soluble APP in a concentration-dependent manner [55]. The effect of nicotine was attenuated with the nAChR



antagonist mecamylamine. Thus, nicotine could enhance the release of APPs through the specific interaction with nAChRs. The effect of nicotine on APP was also observed in stably transfected PC12 cells with the Swedish APP mutation [56]. Some experiments in primary cultured neuron cells indicated that nicotine protects from amyloid and APP metabolic fragments-induced neurotoxicity, probably through the increased release of APPs, which has neurotrophic and neuroprotective activities [57]. Other studies also support the therapeutic potential of nicotine for AD. In this case, nicotine treatment to rats reduces the secretion of APP containing amyloid [58].

To date, several *in vivo* studies using transgenic models of AD have been carried out in order to determine whether nicotine administration affects the pathology of the dementia. Nordberg *et al.* [59] have treated with nicotine, transgenic mice that overexpress human APP bearing a Swedish mutation [Tg(Hu.APP695.K670N-M671L)2576]. These transgenic mice (APPsw) develop amyloid plaques and present cognitive impairments [60]. Nicotine treatment was administered in the drinking water of 9-month-old APPsw mice during 5.5 months. The treatment decreases significantly and dramatically (by more than 80%) amyloid plaque deposition and it reduces the levels of insoluble amyloid 1–40 and 1–42. However, no significant change in soluble amyloid 1–40 or 1–42 levels was observed. The same group demonstrated how effective was a short-term nicotine treatment (for ten days) in reducing insoluble amyloid 1–40 and 1–42 peptides in APPsw mice [61]. In addition, amyloid associated with cerebral vessels was decreased in APPsw mice treated chronically with nicotine. These results support that nicotine may be used for the treatment of AD in order to lower the amyloid plaque burden in the brain. In contrast, as previously reported in this review, Oddo *et al.* [34] suggested that nicotine therapy in AD should be reevaluated since chronic nicotine treatment (for 5 months) to 1 month old 3xTg-AD mice increases tau pathology. Also, Oddo *et al.* [34] confirmed that chronic nicotine treatment did not change the soluble levels of amyloid peptide.

Others approaches have tried to elucidate the effect of nicotine on AD. Although many epidemiological studies focused on the association between smoking and AD had been reported, conclusions reached remain contradictories (see [62] for a review). Briefly, these mixed results could be explained by the analysis used: cohort studies showed that smoking increases the risk for AD whereas case-control studies concluded that smoking was protective [63].

Finally, it is worthy to point out that the possible deleterious effects of nicotine for AD treatment may be due to its non selectivity for nAChRs. The design of selective nicotinic agonists would probably benefit the AD treatment. Notably, similar strategies are supported for treatments against infectious and

inflammatory disorders (revised in [64]). Acetylcholine and nicotine inhibit the production of pro-inflammatory cytokines from macrophages through a mechanism dependent on 7 nAChRs named the "nicotinic anti-inflammatory pathway" [64].

### Muscarinic Receptors

Some evidences presented so far demonstrate that APP processing could be regulated by muscarinic receptors. In different cell lines, muscarinic agonists enhanced the release of soluble APP [65–67]. The use of selective M1 agonists with the consequent M1 mAChRs activation increased the secretion of soluble APP and decreased amyloid production [68].

As previously discussed, the therapeutic benefits of AF267B had been recently tested in a transgenic model of AD [50]. AF267B intake by 3xTg-AD mice reduces amyloid deposition in the cortex and the hippocampus, but not in the amygdala. AF267B affects APP processing causing a selective activation of ADAM 17 enzyme. This finding was in agreement with the amelioration in cognitive deficits observed in treated mice in a spatial task but not in a contextual fear conditioning [50]. Thus, the selective M1 muscarinic agonist AF267B have shown beneficial effects on the major hallmarks of AD and it represents a potential candidate for AD therapy.

### TAU PROTEIN AND AMYLOID $\beta$ INTERACTIONS

The relationship between amyloid deposition and neurofibrillary tangle formation represents a central issue in the pathogenesis of AD. Numerous studies suggest that amyloid enhances tau phosphorylation (Table 1). In primary cultured neurons, amyloid fibrils, but not soluble or amorphous-aggregated, induces the phosphorylation of tau protein at Ser 202 and Ser 396/ Ser 404 and the subsequent accumulation of tau protein in the somatodendritic cell compartment resulting in a loss of microtubule binding capacity [69]. Moreover, treatments of rat hippocampal neurons with amyloid peptide (25–35) increases tau phosphorylation and neuronal death [70]. Using SH-SY5Y human neuroblastoma cells, Shea *et al.* demonstrated that amyloid peptide (25–35) exposure also causes an increase in tau phosphorylation at the site recognized by PHF1 antibody [71]. SN56 hybrid septal cell line treated with aggregated amyloid peptide (1–40) presents cell injury and enhances tau phosphorylation at AT8 and PHF1 sites as well as total tau [72]. Interestingly, the contribution of tau phosphorylation in amyloid-induced neurotoxicity has been controversial. Ekinici *et al.* [73] has reported that tau hyperphosphorylation, although a consequence of amyloid exposure, does not directly mediate the acute degeneration of cultured neurons. Unexpectedly, the healthiest-appearing murine cortical neurons after amyloid treatment



contained more tau protein hyperphosphorylated than the degenerating ones. The production of reactive oxygen species (ROS) has been proposed to be the responsible of amyloid toxicity [73].

The exact mechanisms by which amyloid induces tau phosphorylation are still unclear but they could be related to nAChRs and/or mAChRs signalling.

Recent studies reported that 7 nAChRs may mediate amyloid -induced tau protein phosphorylation. Using systems enriched in 7 nAChR such as SK-N-MC human neuroblastoma cells and hippocampal synaptosomes, treatments with amyloid 42 and 7 nAChR agonists evoked similar tau phosphorylation at Ser 202, Thr 181 and Thr 231 sites *via* ERKs and JNK-1 activation [31]. But pre-treatment with antisense- 7 nAChR in cells or 7 nAChR antagonists in both systems attenuated amyloid -induced tau phosphorylation. In addition, Dineley *et al.* [74] described that picomolar concentrations of amyloid activate whole-cell current responses of 7 nAChR. However, this issue seems controversial because a more recent report has described that amyloid inhibits nAChR function in a dose-dependent manner in neuronal differentiated PC12 cells [75]. In addition, a heptapeptide which binds to amyloid and is homologous to most subtypes of nAChRs completely blocks the inhibition by amyloid . These results suggest that the amyloid binding site in nAChRs is homologous to this heptapeptide [75]. Furthermore, high affinity association of amyloid 42 with 7 and 4 2 nAChRs has been observed in amyloid plaques and neurons of AD patients [76, 77].

Moreover, other studies have reported the role of GSK3 in amyloid -induced increase in tau protein phosphorylation. Takashima *et al.* [70] described that the addition of amyloid peptide to primary cortical and hippocampal neuronal cultures increases GSK3 activity and apoptosis. Lithium prevents the amyloid -induced increase in tau protein phosphorylation (using PHF1 and tau1 antibodies) and inhibits cell death [78]. Assuming that lithium behaves as a specific inhibitor of GSK3, this kinase appears to be a tau kinase induced by amyloid . It has been reported that M1 mAChR activation inhibits GSK3 activity, stabilizes cytoplasmic and nuclear -catenin, and induces the expression of the Wnt target genes engrailed and cyclin-D1, reverting the switch off of the Wnt pathway caused by amyloid -toxicity [79]. Thus, the activation of M1 mAChR might provide protection against amyloid insults, resulting in tau phosphorylation.

In summary, nAChR activation significantly increases tau phosphorylation whereas mAChR activation prevents that phosphorylation.

## REFERENCES

- [1] Alzheimer, A. (1906) *Neurologisches Centralblatt*, **25**, 146-148.
- [2] Avila, J., Lucas, J.J., Perez, M. and Hernandez, F. (2004) *Physiol. Rev.*, **84**, 361-84.
- [3] Alonso, A., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6923-8.
- [4] Iqbal, K., Alonso, A.D., Gong, C.X., Khatoon, S., Pei, J.J., Wang, J.Z. and Grundke-Iqbal, I. (1997) In: *Brain Microtubule Associated*, pp. 95-111 (Avila, J., Brandt, R. and Kosik, K.S., Eds.) Harwood Academic Publ GmbH, Poststrasse 22, 7000 Chur, Switzerland.
- [5] Goedert, M., Cohen, E.S., Jakes, R. and Cohen, P. (1992) *FEBS Lett.*, **312**, 95-9.
- [6] Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T. and Hyman, B.T. (1992) *Neurology*, **42**, 631-9.
- [7] Selkoe, D.J. (2004) *Ann. Intern. Med.*, **140**, 627-38.
- [8] Bowen, D.M., Smith, C.B., White, P. and Davison, A.N. (1976) *Brain*, **99**, 459-96.
- [9] Davies, P. and Maloney, A.J. (1976) *Lancet*, **2**, 1403.
- [10] Perry, E.K., Blessed, G., Tomlinson, B.E., Perry, R.H., Crow, T.J., Cross, A.J., Dockray, G.J., Dimaline, R. and Arregui, A. (1981) *Neurobiol. Aging*, **2**(4), 251-6.
- [11] Geula, C. and Mesulam, M.M. (1996) *Cereb. Cortex*, **6**, 165-77.
- [12] Cummings, J.L. (2004) *N. Engl. J. Med.*, **351**, 56-67.
- [13] Wolf, N.J. (1996) *Neurobiol. Learn. Mem.*, **66**, 258-266.
- [14] Gotti, C. and Clementi, F. (2004) *Prog. Neurobiol.*, **74**, 363-396.
- [15] Wevers, A. and Schroder, H. (1999) *J. Alzheimers Dis.*, **1**, 207-219.
- [16] Wevers, A., Monteggia, L., Nowacki, S., Bloch, W., Schutz, U., Lindstrom, J., Pereira, E.F., Eisenberg, H., Giacobini, E., de Vos, R.A., Steur, E.N., Maelicke, A., Albuquerque, E.X. and Schroder, H. (1999) *Eur. J. Neurosci.*, **11**(7), 2551-65.
- [17] Levey, A.I., Kitt, C.A., Simonds, W.F., Price, D.L. and Brann, M.R. (1991) *J. Neurosci.*, **11**, 3218-3226.
- [18] Wei, J., Walton, E.A., Milici, A. and Buccafusco, J.J. (1994) *J. Neurochem.*, **63**, 815-821.
- [19] Anagnostaras, S.G., Murphy, G.G., Hamilton, S.E., Mitchell, S.L., Rahnama, N.P., Nathanson, N.M. and Silva, A.J. (2003) *Nat. Neurosci.*, **6**, 51-8.
- [20] Martin-Ruiz, C.M., Court, J.A., Molnar, E., Lee, M., Gotti, C., Mamalaki, A., Tsouloufis, T., Tzartos, S., Ballard, C., Perry, R.H. and Perry, E.K. (1999) *J. Neurochem.*, **73**, 1635-1640.
- [21] Burghaus, L., Schutz, U., Krempel, U., de Vos, R.A., Jansen, Steur, E.N., Wevers, A., Lindstrom, J. and Schroder, H. (2000) *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **76**, 385-8.
- [22] Perry, E.K., Morris, C.M., Court, J.A., Cheng, A., Fairbairn, A.F., McKeith, I.G., Irving, D., Brown, A. and Perry, R.H. (1995) *Neuroscience*, **64**, 385-398.
- [23] Flynn, D. and Mash, D.C. (1986) *J. Neurochem.*, **47**, 1948-1954.
- [24] Banerjee, C., Nyengaard, J.R., Wevers, A., de Vos, R.A., Jansen, Steur, E.N., Lindstrom, J., Pilz, K., Nowacki, S., Bloch, W. and Schroder, H. (2000) *Neurobiol. Dis.*, **7**(6 Pt B), 666-72.
- [25] Nordberg, A., Lundqvist, H., Hartvig, P., Andersson, J., Johansson, M., Hellstrom-Lindahl, E. and Langstrom, B. (1997) *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, **8**, 78-84.
- [26] Hellstrom-Lindahl, E. (2000) *Eur. J. Pharmacol.*, **393**, 255-63.
- [27] Hellstrom-Lindahl, E., Moore, H. and Nordberg, A. (2000) *J. Neurochem.*, **74**, 777-84.
- [28] Arias, E., Gallego-Sandin, S., Villarroya, M., Garcia, A.G. and Lopez, M.G. (2005) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **315**(3), 1346-53.
- [29] Pereira, E.F., Alkondon, M., Reinhardt, S., Maelicke, A., Peng, X., Lindstrom, J., Whiting, P. and Albuquerque, E.X. (1994) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **270**, 768-78.
- [30] Svensson, A.L. (2000) *Behav. Brain Res.*, **113**, 193-7.
- [31] Wang, H.Y., Li, W., Benedetti, N.J. and Lee, D.H. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 31547-53.
- [32] Ulrich, J., Johansson-Locher, G., Seiler, W.O. and Stahelin, H.B. (1997) *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **94**, 450-4.
- [33] Tyas, S.L., White, L.R., Petrovitch, H., Webster Ross, G., Foley, D.J., Heimovitz, H.K. and Launer, L.J. (2003) *Neurobiol. Aging*, **24**, 589-596.
- [34] Oddo, S., Caccamo, A., Green, K.N., Liang, K., Tran, L., Chen, Y., Leslie, F.M. and LaFerla, F.M. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 3046-51.
- [35] Billings, L.M., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L. and LaFerla, F.M. (2005) *Neuron*, **45**, 675-688.
- [36] Kitazawa, M., Oddo, S., Yamasaki, T.R., Green, K.N. and LaFerla, F.M. (2005) *J. Neurosci.*, **25**, 8843-8853.
- [37] Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y. and LaFerla, F.M., (2003) *Neuron*, **39**, 409-421.

- [38] Benwell, M., Balfour, D., Andersson, J. (1988) *J. Neurochem.*, **50**, 1243-7.
- [39] Court, J. A., Lloyd, S., Thomas, N., Piggott, M. A., Marshall, E. F., Morris, C. M., Lamb, H., Perry, R. H., Johnson, M. and Perry, E. K. (1998) *Neuroscience*, **87**, 63-78.
- [40] Dajas-Bailador, F. and Wonnacott, S. (2004) *Trends Pharmacol. Sci.*, **25**, 317-24.
- [41] Sugaya, K., Giacobini, E. and Chiappinelli, V.A. (1990) *J. Neurosci. Res.*, **27**, 349-359.
- [42] Nordberg, A., Alafuzoff, I. and Winblad, B., (1992) *J. Neurosci. Res.*, **31**, 103-111.
- [43] Pavia, J., de Ceballos, M.L. and Sanchez de la Cuesta, F. (1998) *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **12**, 473-481.
- [44] Ladner, C.J. and Lee, J.M. (1998) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **57**, 719-731.
- [45] Fisher, A. (2000) *Jpn. J. Pharmacol.*, **84**, 101-12.
- [46] Sadot, E., Gurwitz, D., Barg, J., Behar, L., Ginzburg, I. and Fisher, A. (1996) *J. Neurochem.*, **66**, 877-80.
- [47] Forlenza, O.V., Spink, J.M., Dayanandan, R., Anderton, B.H., Olesen, O.F. and Lovestone, S. (2000) *J. Neural. Transm.*, **107**, 1201-12.
- [48] Genis, I., Fisher, A. and Michaelson, D.M. (1999) *J. Neurochem.*, **72**, 206-13.
- [49] Fisher, A., Brandeis, R., Haring, R., Eshhar, N., Heldman, E., Karton, Y., Eisenberg, O., Meshulam, H., Marciano, D., Bar-Ner, N. and Pittel, Z. (1998) *J. Physiol. Paris*, **92**(5-6), 337-40.
- [50] Caccamo, A., Oddo, S., Billings, L.M., Green, K.N., Martinez-Coria, H., Fisher, A., Laferla, F.M. (2006) *Neuron*, **2**, **49**, 671-82.
- [51] Salomon, A.R., Marcinowski, K.J., Friedland, R.P. and Zagorski, M.G. (1996) *Biochemistry*, **35**, 13568-13578.
- [52] Zeng, H., Zhang, Y., Peng, L.-J., Shao, H., Menon, N.K. and Yang, J. (2001) *Biol. Psychiatry*, **49**, 248-257.
- [53] Ono, K., Hasegawa, K., Yamada, M. and Naiki, H. (2002) *Biol. Psychiatry*, **52**, 880-6.
- [54] Sands, S.B. and Barish, M.E. (1992) *J. Physiol.*, **447**, 467-487.
- [55] Kim, S.H., Kim, Y.K., Jeong, S.J., Haass, C., Kim, Y.H. and Suh, Y.H. (1997) *Mol. Pharmacol.*, **52**, 430-436.
- [56] Kuisak, J.W., Northon, D.D., Sisodia, S.S. and Zhao, B. (1999) *Soc. Neurosci. Abstr.*, **25**, 598.
- [57] Seo, J., Kim, S., Kim, H., Park, C.H., Jeong, S., Lee, J., Choi, S.H., Chang, K., Rah, J., Koo, J., Kim, E. and Suh, Y. (2001) *Biol. Psychiatry*, **49**(3), 240-7.
- [58] Lahiri, D.K., Utsuki, T., Chen, D., Farlow, M.R., Shoaib, M., Ingram, D.K. and Greig, N.H. (2002) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **965**, 364-72.
- [59] Nordberg, A., Hellström-Lindahl, E., Lee, M., Johnson, M., Mousavi, M., Hall, R., Perry, E., Bednar, I. and Court, J. (2002) *J. Neurochem.*, **81**, 655-658.
- [60] Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F. and Cole, G. (1996) *Science*, **274**, 99-102.
- [61] Hellstrom-Lindahl, E., Court, J., Keverne, J., Svedberg, M., Lee, M., Marutle, A., Thomas, A., Perry, E., Bednar, I. and Nordberg, A. (2004) *Eur. J. Neurosci.*, **19**(10), 2703-10.
- [62] Oddo, S. and Laferla, F.M. (2006) *J. Physiol. Paris*, **99**, 172-9.
- [63] Almeida, O.P., Hulse, G.K., Lawrence, D. and Flicker, L. (2002) *Addiction*, **97**, 15-28.
- [64] Ulloa, L. (2005) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 673-84.
- [65] Nitsch, R.M., Slack, B.E., Wurtman, R.J. and Growdon, J.H., (1992) *Science*, **258**, 304-307.
- [66] Buxbaum, J.D., Ruefli, A.A., Parker, C.A., Cypress, A.A. and Greengard, P. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4489-4493.
- [67] Wolf, B.A., Wertkin, A.M., Jolly, Y.C., Yasuda, R.P., Wolfe, B.B., Konrad, R.J., Manning, D., Ravi, S., Williamson, J.R. and Lee, V.M.-Y. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 4916-4922.
- [68] Fisher, A., Pittel, Z., Haring, R., Bar-Ner, N., Kliger-Spatz, M., Natan, N., Egozi, I., Sonego, H., Marcovitch, I. and Brandeis, R. (2003) *J. Mol. Neurosci.*, **20**, 349-56.
- [69] Busciglio, J., Lorenzo, A., Yeh, J. and Yankner, B.A. (1995) *Neuron*, **14**, 879-88.
- [70] Takashima, A., Noguchi, K., Michel, G., Mercken, M., Hoshi, M., Ishiguro, K. and Imahori, K. (1996) *Neurosci. Lett.*, **203**, 33-6.
- [71] Shea, T.B., Prabhakar, S. and Ekinci, F.J. (1997) *J. Neurosci. Res.*, **49**, 759-68.
- [72] Le, W.D., Xie, W.J., Kong, R. and Appel, S.H. (1997) *J. Neurochem.*, **69**, 978-85.
- [73] Ekinci, F.J. and Shea, T.B. (2000) *J. Alzheimers. Dis.*, **2**, 7-15.
- [74] Dineley, K.T., Bell, K.A., Bui, D. and Sweatt, J.D. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 25056-61.
- [75] Magdesian, M.H., Nery, A.A., Martins, A.H., Juliano, M.A., Juliano, L., Ulrich, H. and Ferreira, S.T. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 31085-90.
- [76] Wang, H.Y., Lee, D.H., D'Andrea, M.R., Peterson, P.A., Shank, R.P. and Reitz, A.B. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 5626-32.
- [77] Nagele, R.G., D'Andrea, M.R., Anderson, W.J. and Wang, H.Y. (2002) *Neuroscience*, **110**, 199-211.
- [78] Alvarez, G., Munoz-Montano, J.R., Satrustegui, J., Avila, J., Bogonez, E. and Diaz-Nido, J. (1999) *FEBS Lett.*, **453**, 260-4.
- [79] Farias, G.G., Godoy, J.A., Hernandez, F., Avila, J., Fisher, A. and Inestrosa, N.C. (2004) *Neurobiol. Dis.*, **17**, 337-48.

# Effect of Acetylcholine on Tau Phosphorylation in Human Neuroblastoma Cells

*Alicia Rubio, Jesús Ávila,\* and Mar Pérez*

*Centro de Biología Molecular (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, 28048 Madrid, Spain*

## Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a senile dementia characterized by a progressive loss of memory, together with cognitive and behavioral impairments. In the past it was indicated that the disease was associated with a loss of acetylcholine (ACh) in the cerebral cortex (Bowen et al., 1976; Davies and Maloney, 1976); afterward, it was indicated that the severity of dementia was correlated with the extent of cholinergic loss (Perry et al., 1981). Because one of the biochemical features of AD is modification by phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (for review, see Ávila et al., 2004), in this work we indicate the effect of ACh on tau phosphorylation at specific sites recognized by 12E8 and PThr50 antibodies in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Two sites in which modification might regulate the binding of tau to microtubules (Novak et al., 1991; Feijoo et al., 2004).

## Materials and Methods

### *Antibodies and Reagents*

The antibody 7.51 (a gift from Dr. C. Wischik, Medical Research Council Center, Cambridge, UK) was used to detect total tau in immunoblot analysis (Novak et al., 1991). Antibody 12E8 (Athena Laboratories), which recognizes tau phosphorylated at serine 262, was a gift from Dr. P. Seubert (Seubert et al., 1995). Antibody PHF1, which recognizes tau phosphorylated at Ser396 and Ser404 was a gift from Dr. P. Davies (Albert Einstein College of Medicine,

Bronx, NY). Antibody tau-1 (Chemicon, Temecula, CA) recognizes tau dephosphorylated at Ser199 and Ser202. Antibody PThr50 and unphosphorylated peptide (from residues 44–55 from human tau 40) were gifts from Dr. A. Cuenda (University of Dundee, UK). PThr50 antibody recognizes tau phosphorylated at residue Thr50 (Feijoo et al., 2004). Acetylcholine (ACh) was purchased from Sigma.

### *Cell-Culture Conditions*

SH-SY5Y cells (Biedler et al., 1978) were grown in Dulbecco's modified Eagle medium with 10% fetal bovine serum containing 2 mM glutamine and 100 U/mL antibiotics in a humidified atmosphere at 37°C with 7% CO<sub>2</sub>. Cells were incubated in neurobasal medium (GIBCO) for 2 h and treated with 10 μM ACh.

### *Protein Isolation and Immunoblot Analysis*

Protein extraction and immunoblot analysis from SH-SY5Y cells and brain samples from AD patients (supplied by R. Ravid, Netherlands Brain Bank) was done following the procedure of Pérez et al. (2002). Primary antibody dilutions were 7.51 (1/100), tau-1 (1/1000), PHF1 (1:100), and 12E8 (1/1000). Membrane for PThr50 recognition was incubated with 1 μg/mL PThr50 antibody and 100 μg/mL peptide.

## Results and Discussion

### *ACh Affects Phosphorylation Levels in Sites Recognizes by 12E8*

SH-SY5Y cells were treated with 10 μM ACh, and tau phosphorylation at site 12E8 was tested. Figure 1

\*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed. E-mail: javila@cbm.uam.es

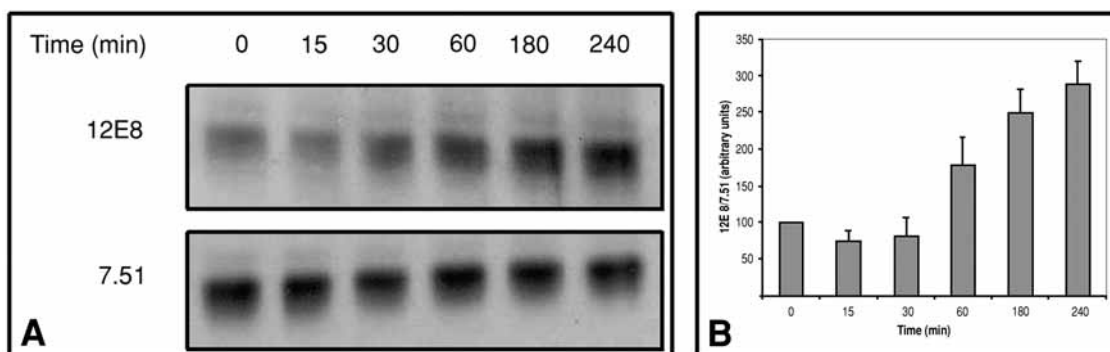


Fig. 1. Phosphorylation of tau at the site recognized by 12E8 antibody in SH-SY5Y cells treated with 10  $\mu$ M ACh for different incubation times. (A) Western blots showing tau phosphorylation at 12E8 and total tau with MAb 7.51 in untreated (0) or incubated cells in the presence of 10  $\mu$ M ACh for 15, 30, 60, 180, and 240 min. (B) Quantifications by densitometry. The data correspond to mean values and S.D. from three experiments.

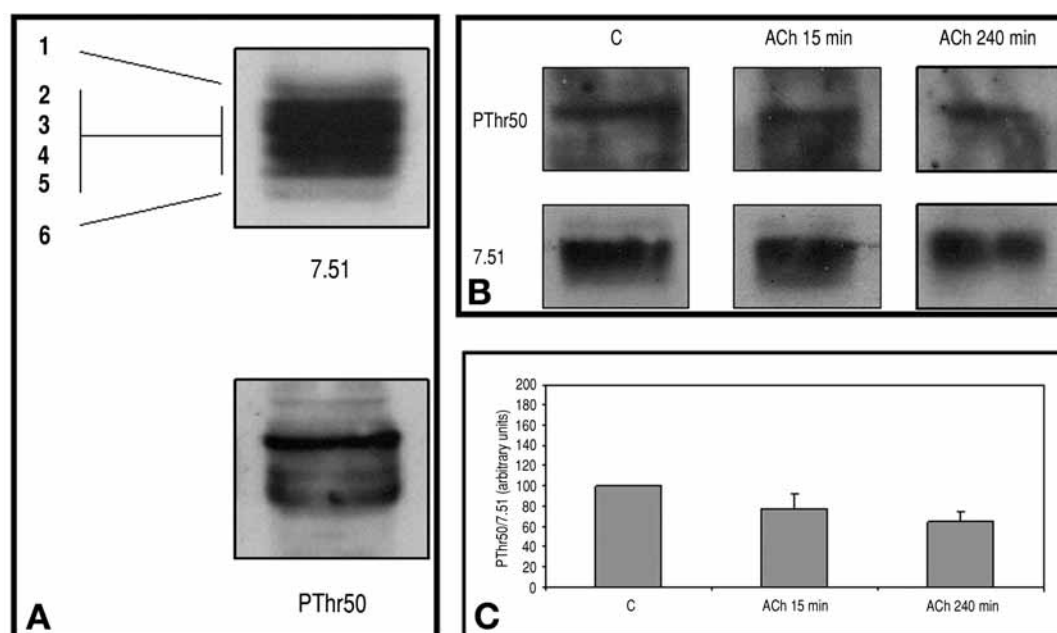


Fig. 2. Phosphorylation of tau at the site recognized by PThr50 antibody. (A) Western blot showing six bands (1–6) of tau molecules recognized by MAb 7.51 in brain samples from AD patients and one major band of tau recognized by PThr50 antibody. (B) Phosphorylation of tau at the site recognized by PThr50 antibody in SH-SY5Y cells treated with 10  $\mu$ M ACh for 15 and 240 min. (C) Quantifications by densitometry. The data shown correspond to mean values and S.D.

(A,B) shows that there is a slight decrease in the phosphorylation of tau protein at site 12E8 when incubation lasts for 15 min. However, ACh incubations for 30, 60, 180, and 240 min increase tau phosphorylation progressively at the site recognized by 12E8.

#### **ACh Affects Phosphorylation Levels in Sites Recognized by Antibody Raised Against PThr50**

We characterize PThr50 antibody by running brain samples from AD patients in a polyacrylamide gel.

The incubation with 7.51 antibody reveals six different bands (Fig. 2A), and the use of PThr50 antibody elicits one major band (Fig. 2A). We conclude that PThr50 antibody mainly recognizes the slowest migrating species, indicating that only a proportion of adult tau molecules is phosphorylated at the PThr50 epitope.

Because the major effects of 10  $\mu$ M ACh treatment on tau phosphorylation at 12E8 sites in SH-SY5Y cells were observed in incubations of 15 and 240 min,

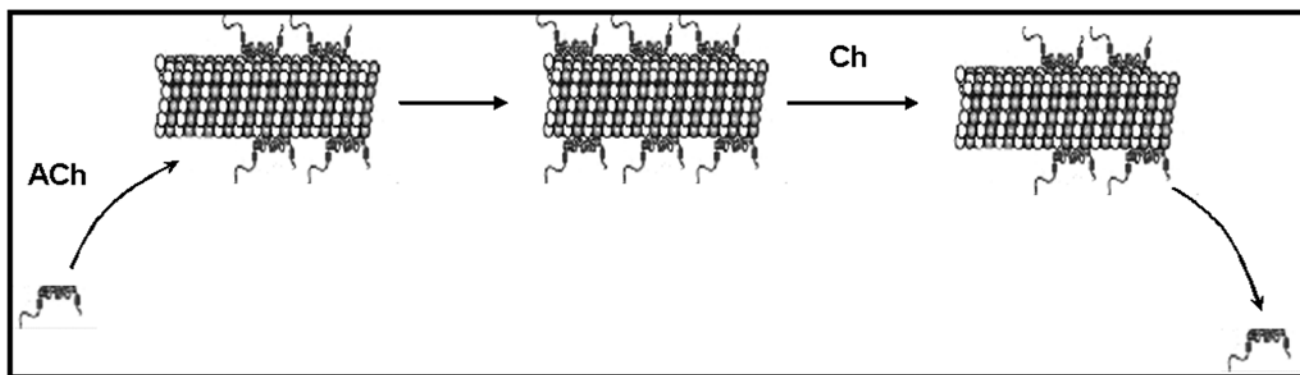


Fig. 3. Model showing the influence of ACh and choline (Ch) in tau microtubule binding. ACh has been proposed to enhance the binding of tau to the microtubule. However, choline action could destabilize tau binding to microtubules.

we tested tau phosphorylation at other sites using PThr50 antibody (Fig. 2B). In this case, data indicate that short incubation time with 10  $\mu$ M ACh in SH-SY5Y cells does not modify PThr50 levels. However, long-lasting incubation with ACh decreases tau phosphorylation at the site recognized by PThr50 antibody (Fig. 2C), decreasing tau microtubule binding.

Immunoreactivity of PThr50 antibody in SH-SY5Y extracts shows that this human neuroblastoma cell line contains tau isoforms with the first N-terminal insert, or exon 2. This evidence is in agreement with work done by Feijoo et al. (2004).

In conclusion, our work in SH-SY5Y human neuroblastoma cells treated with ACh reveals two distinct effects in tau phosphorylation at 12E8 and PThr50 sites with different physiological consequences. No effect was observed in tau phosphorylation at PHF1 and tau-1 sites (data not shown). Short incubation times with ACh promote tau microtubule binding, evidenced by a slight decrease in 12E8 immunoreactivity (Fig. 3). However, long-lasting incubations with ACh increase phosphorylation at the site recognized by 12E8 antibody and decrease phosphorylation at the PThr50 site, suggesting that tau release from microtubules is facilitated (Fig. 3).

ACh is characterized by its fast turnover due to the rapid hydrolysis of the compound into acetate and choline (Ch). Based on this evidence, we suggest that long lasting effects of ACh observed in tau phosphorylation of SH-SY5Y cells may be produced by Ch. Ch action could affect to an increase in calcium concentration (Alkondon et al., 1997) that could regulate some tau kinases which may modify Thr50 and Ser 262 sites.

## Acknowledgments

We thank Ana Cuenda (University of Dundee) for comments and for providing PThr50 antibody. A. R. has been supported by a fellowship from Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

## References

- Alkondon M., Pereira E. F., Cortes W. S., Maelicke A., and Albuquerque E. X. (1997) Choline is a selective agonist of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors in rat brain neurons. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 2734–2742.
- Ávila J., Lucas J. J., Pérez M., and Hernández F. (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions, *Physiol. Rev.* **84**, 361–384.
- Biedler J. L., Roffler-Tarlow S., Schachner M., and Freedman L. S. (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* **38**, 3751–3757.
- Bowen D. M., Smith C. B., White P., and Davison A. N. (1976) Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* **99**, 459–496.
- Davies P. and Maloney A. J. (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* **25**, 1403.
- Feijoo C., Campbell D. G., Jakes R., Goedert M., and Cuenda A. (2004) Evidence that phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau by SAPK4/p38delta at Thr50 promotes microtubule assembly. *J. Cell Sci.* **118**, 387–408.
- Novak M., Jakes R., Edwards P. C., Milstein C., and Wischik C. M. (1991) Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 7.51. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 5837–5841.
- Pérez M., Hernández F., Gómez-Ramos A., Smith M., Perry G., and Ávila J. (2002) Formation of aberrant phosphotau polymers in neural cultured cells. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1484–1489.

- Perry E. K., Blessed G., Tomlinson B. E., Perry R. H., Crow T. J., Cross A. J., et al. (1981) Neurochemical activities in human temporal lobe related to aging and Alzheimer-type changes. *Neurobiol. Aging* **2**, 251–256.
- Seubert P., Mawal-Dewan M., Barbour R., Jakes R., Goedert M., Johnson G. V., et al. (1995) Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J. Biol. Chem.* **270**, 18,917–18,922.



# Expert Opinion

1. Introduction
2. Role of somatostatin in immune function
3. Therapeutic applications of somatostatin and its analogues
4. A role for cortistatin in immune modulation/inflammation
5. Mechanisms of the anti-inflammatory effect of cortistatin
6. Expert opinion

For reprint orders,  
please contact:  
[ben.fisher@informa.com](mailto:ben.fisher@informa.com)

**informa**  
healthcare

Anti-inflammatory

## Cortistatin as a therapeutic target in inflammation

Alicia Rubio, Jesús Ávila & Luis de Lecea<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Stanford University, Department of Psychiatry and Behavioural Sciences, 701B Welch Road, Palo Alto, Stanford, CA 94304, USA

Cortistatin (CST) is a recently discovered neuropeptide from the somatostatin gene family, named after its predominantly cortical expression and ability to depress cortical activity. CST shows many remarkable structural and functional similarities to its related neuropeptide somatostatin, or somatotropin release-inhibiting factor. However, the many physiological differences between CST and somatostatin are just as remarkable as the similarities. CST-29 has recently been shown to prevent inflammation in rodent models for human diseases, raising novel therapeutic properties to this neuropeptide. In this review, the authors address a new possible role for CST in the immune system and evaluate the possible therapeutic use of CST to treat disorders associated with inflammation.

**Keywords:** Crohn's disease, immune system, intestinal inflammation, somatostatin

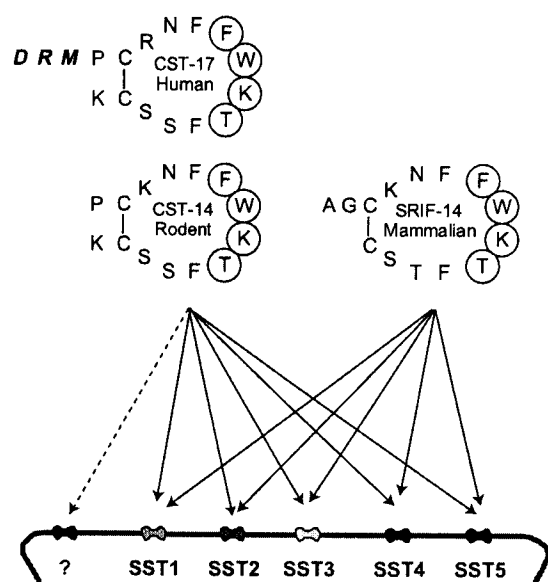
*Expert Opin. Ther. Targets* (2007) 11(1):1-9

### 1. Introduction

Nervous, immune and endocrine systems regulate body homeostasis through a complex cross-talk that involves cell-to-cell contact, paracrine or endocrine modes of action and activation of specific receptors on target cells by soluble signalling molecules. Neuropeptides, such as cortistatin (CST) and somatostatin (somatotropin release-inhibiting factor, SRIF), belong to these regulatory molecules and can be considered as immunomodulators, participating in various aspects of immune system function and pathology.

CST was discovered in a subtractive hybridisation screen to identify molecules differentially expressed in cortical and hippocampal structures [1]. Rodent preprocortistatin shows extensive similarity to the neuropeptide somatostatin in the C-terminus. In fact, 11 of its 14 residues are conserved between the two peptides. Human preprocortistatin-deduced amino acid sequence has 114 residues and begins with a 29 amino acid hydrophobic putative secretory signal sequence [2]. Analysis of the putative processing sites in human preprocortistatin revealed that it may be cleaved at two RR sites, giving rise to hCST-29 and a C-terminal 17 residue peptide (hCST-17) that shares 13 of the last 14 residues with rat and mouse CST-14. Evolutionarily, preprocortistatin and preprosomatostatin originated as a gene duplication which shares a common ancestor gene with the urotensin family [3].

Although preprocortistatin mRNA was initially discovered in rodents and found to be mainly restricted to the cerebral cortex and hippocampus, many expressed sequence tags (ESTs) encoding human preprocortistatin have been obtained from tumours and peripheral tissues, including cells of immune origin [4,5]. In contrast, human somatostatin-encoding ESTs are mainly restricted to the brain, pancreas and endocrine tissue. This observation suggests that the actions of somatostatin in the periphery, with the notable exception of the inhibition of glucagon release, could be attributed to CST instead [6].



**Figure 1. Cyclic structures of CST-14, hCST-17 and SRIF-14.** The exocyclic residues and the shared amino acid sequence (FWKT) responsible for binding to the five cloned somatostatin receptors (1 – 5) are highlighted. It remains to be clarified whether or not the functional differences between CST-14/hCST-17 and SRIF-14 are due to the existence of a specific CST receptor. Somatostatin receptor heterodimers, MgrX2 and growth hormone secretagogue receptor are possible candidates. CST: Cortistatin; SRIF: Somatotropin release-inhibiting factor; SST: Somatostatin receptor.

## 2. Does cortistatin bind to its own receptor?

CST and somatostatin share the hydrophobic core of amino acids (FWKT) that are critical for binding to its receptors, as well as the two cysteine residues that render the peptides cyclic [7]. Therefore, the strong structural similarity between CST-14 and somatostatin suggests that CST-14 might bind to somatostatin receptors. Somatostatin binds to five different known receptors, named SST 1 – 5, which are members of the 7-transmembrane G-protein-coupled receptor superfamily and display distinct, but overlapping, expression patterns [8]. Alternative splicing generates two protein isoforms of SST2 subtype: SST2a and SST2b [9,10]. These two proteins differ in the length of their carboxy-terminal tail. The short protein variant (SST2b) is not abundantly expressed in humans [9,10]. rCST-14 and hCST-17 have been shown to displace <sup>125</sup>I-SRIF-14 binding to each of the 5 cloned human SST receptors expressed in transfected cell lines [11–13], and in normal human thymic tissue [14] with affinities in the low nanomolar range similar to those of SRIF-14. CST-14 has also been shown to be an effective agonist to SST receptors expressed by GH4 cells, with indistinguishable efficacy from SRIF-14 [1] (Figure 1).

In the CNS, the activities of CST appear to be different from those of somatostatin, consistent with the notion that in the brain CST-14 binds to a receptor, or combination of receptors, that is essentially different from those that bind somatostatin. In the initial characterisation of CST, rat CST-14 inhibited the activity of hippocampal neurons [1]. However, unlike somatostatin, intracerebral injection of the peptide caused a dramatic increase in slow wave sleep. Also in contrast to somatostatin, CST antagonises the effects of acetylcholine on cortical excitability [1]. Further studies have demonstrated that CST-14, but not SRIF-14, enhances the h-current [15], strongly suggesting that CST-14 activates a different signalling system from somatostatin. Alternatively, CST may bind and activate heterodimeric receptors [16], or receptors modified by accessory proteins, such as receptor activity-modifying proteins (RAMPS) [17].

Indeed, it has recently been shown that CST-14 and hCST-17, but not SRIF-14, bind to the growth hormone (GH)-secretagogue receptors with similar affinity as ghrelin [18]. Furthermore, the human orphan G-protein-coupled receptor MgrX2 has been described as the first human CST-selective receptor [19]. Indeed, both CST-14 and hCST-17 bind MgrX2 with high affinity, and MgrX2 showed no affinity for SRIF-14, confirming the data of the authors on structure–activity relationships [11]. Moderate levels of MgrX2 are observed in subsets of neurons in the CA2, CA3 and CA4 of the hippocampus. MgrX2 is not detected in the cerebral cortex, suggesting that another receptor might be responsible for the sleep-inducing properties of CST. MgrX2 has been detected in the hypothalamus, pituitary, thyroid, lung, gastroenteropancreatic tract, testis and ovary, and was negative in the cerebral cortex, parathyroid and adrenal, as well as in a variety of tumour types [5]. Interestingly, MgrX2 has also been shown to bind proadrenomedullin N-terminal peptides (PANP) with high affinity [20]. Nothacker *et al.* suggest that both CST and PANP bind to and activate MgrX2 receptor at the same receptor site due to a common internal structural motif that is centred around an octapeptide that alternates aromatic and basic amino acids [21].

## 3. Role of somatostatin in immune function

Different somatostatin regulatory actions, mostly inhibitory, on the immune system have been reported. Somatostatin seems to mediate the inhibition of lymphocyte proliferation in both human and murine models [22,23]. Consistently, somatostatin was found in lymphocytes and monocytes [24]. Hofland and co-workers have investigated the expression of SST receptors in human immune cells [25]. Human peripheral blood B and T lymphocytes selectively express SST 3 receptor, whereas monocytes do not express somatostatin. However, upon activation, monocytes are induced to express SST2A. In this study, no expression of somatostatin mRNA was detected in any cell type, whereas CST mRNA was detected in all cell types.



Besides the effect of somatostatin on cell proliferation, somatostatin reduces T lymphocyte secretion, including cytokines and IFN- $\gamma$  [26]. Somatostatin inhibits the spontaneous and TNF- $\alpha$ -induced secretion of different cytokines, such as IL-1 $\beta$  or IL-8, in rat activated hepatic stellate cells, which have been associated with hepatic fibrosis [27]. Different murine inflammatory cells derived from Schistosoma-induced liver granulomas have been shown to express SST2 mRNA. As somatostatin inhibits IFN- $\gamma$  secretion by dispersed granuloma cells, the neuropeptide somatostatin has been proposed as a novel therapeutic agent against liver granulomas and the associated hepatic fibrosis [28,29].

Somatostatin has been shown to affect different functions in monocytes and macrophages in humans and rodents. Somatostatin reduces the secretion of the superoxide anion from stimulated monocytes [30] and antagonises the chemotaxis of human monocytes in response to growth hormone [31]. Moreover, somatostatin reduces IL-6 and IFN- $\gamma$  release [32] and enhances apoptosis in mouse peritoneal macrophages [33]. Also, Ahmed *et al.* have shown that somatostatin can reduce macrophage migration in mouse cell lines [34]. It should be noted that interspecies differences in SST receptor expression and signalling may be reflected in different responses to stimulation of immune cells.

In glial cells, where SST receptors are expressed [35], anti-inflammatory effects induced by somatostatin have been described. Somatostatin decreases basal and forskolin-stimulated IL-6 secretion of rat astrocytes [36] and inhibited the basal and stimulated proliferation of rat microglial cells [37].

These studies suggest that somatostatin plays an active role in regulating the immune system and the inflammatory response in both physiological and pathological conditions.

#### 4. Therapeutic applications of somatostatin and its analogues

Despite the wide range of therapeutic targets of somatostatin due to its numerous physiological roles, the clinical value of SRIF-14 is constrained by its instability (half-life in circulation < 3 min) and its lack of selectivity (somatostatin binding with high affinity to all 5 cloned SST receptor subtypes). In the early 1980s, stable somatostatin analogues were synthesised to overcome these clinical use disadvantages. The octapeptide analogues octreotide and lanreotide bind SST2 with higher affinity and SST3 and SST5 with lower affinity, but they do not bind SST1 or SST4. The different binding profiles of octreotide and lanreotide make them suitable for antitumoural therapy because most human tumours preferentially overexpress SST2 [38]. More recently, and to improve the clinical oncology, new somatostatin analogues, such as TT-232 or SOM230, have been developed [39,40]. The potential efficacy of somatostatin and its analogues against inflammatory diseases will be discussed below.

Somatostatin and its synthetic analogues (octreotide, vapreotide, lanreotide) have been approved for clinical

treatment of acromegaly and different gastrointestinal disorders [41,42]. Due to its short duration of action, SRIF-14 use is limited to acute conditions, such as oesophageal variceal bleeding [43], whereas somatostatin synthetic analogues are required for chronic treatments. Somatostatin analogues can be administered chronically by the intravenous route, by multiple subcutaneous injections or by continuous depot formulation [44]. Symptoms associated with gastrointestinal endocrine tumours, such as vasoactive intestinal peptide-secreting tumours (VIPomas) or carcinoid syndrome, are controlled with somatostatin analogues [42]. In addition, synthetic somatostatin receptor agonists are used to treat pancreatitis, surgical complications and to protect against pituitary adenomas and gastroenteropancreatic tumours [45].

Because of the antineoplastic and apoptosis-inducing properties of somatostatin and its synthetic analogues, SST receptor agonists have been proposed as novel therapeutic approaches in clinical oncology [46]. Abundant studies have been conducted to elucidate the mechanisms of SST receptor agonists. Direct binding to neoplastic SST receptors, inhibition of GH release, reduction of IGF-1 secretion or antiangiogenic effect are some of the proposals [47]. Despite the abundant efforts, the antitumour therapeutic efficacy of somatostatin and its analogues remain to be established. Nevertheless, SST analogues are currently used for tumour diagnostic procedures. SST receptor scintigraphy is based on radioimmunolabelled derivatives of somatostatin analogues (octreotide, vapreotide and lanreotide) used for the *in vivo* detection of neuroendocrine tumours that overexpress SST receptor [23,48,49].

As somatostatin was shown to possess anti-inflammatory activity and its binding sites were present in tissue obtained from patients with different inflammatory diseases [50-52], somatostatin analogues have been considered as potential treatments of inflammation diseases leading to some experimental studies on several inflammation models (Table 1).

Although these experimental results seem promising, more experiments remain to be done before using the SST receptor agonists for the treatment of inflammatory diseases or gastrointestinal disorders.

#### 5. A role for cortistatin in immune modulation/inflammation

By analogy with somatostatin, it is expected that interaction of CST with either SST receptors or CST-specific receptors will mediate different functions. Rauca *et al.* [53] have shown that CST can protect against neuronal injury caused by ischaemia. Several groups have shown that intracerebroventricular injection of CST impairs long-term memory [54,55]. Interestingly, precortistatin mRNA is upregulated in the dentate gyrus during ageing in a mouse model of Alzheimer's disease, suggesting that the inhibitory actions of CST in this region correlate with inflammation [56].

**Table 1. Therapeutic effects of somatostatin and its analogues on different inflammation-related disorders.**

Compounds	Therapeutic effect	References
SRIF-14	Analgesic effects in rheumatoid arthritis patients	[73]
SRIF-14 and octreotide	Reduction of the TNF- $\alpha$ -induced secretion of pro-inflammatory mediators from intestinal epithelial cells	[74]
Octreotide	Mucosal damage amelioration in a murine model of colitis	[75]
	Protection against diarrhoea in patients with chemotherapy treatment or AIDS	[76,77]
	Vitreous haemorrhage reduction in patients with diabetic retinopathy	[78]
Octreotide and lanreotide	Reduction of the leukocyte accumulation in rats subjected to carrageenin-induced oedema	[79]
	Therapeutic effect against thyroid eye disease in clinical trials	[80,81]
Somatostatin analogue TT-232	Analgesic effect in rodent models decreasing the levels of substance P	[82,83]
	Protection from an adjuvant-induced chronic arthritis model in rats	[84]

SRIF: Somatotropin release-inhibiting factor.

Recent studies demonstrated the endocrine activities of CST. Indeed, CST-14 and hCST-17 have been shown to bind to GH secretagogue receptor in human tissue [18], which has been shown to display anti-inflammatory activity in humans [57,58].

All measures of CST activity in humans are undistinguishable from those of somatostatin [59]. Broglio *et al.* [60] showed that, like somatostatin, hCST-17 inhibits both basal and GH-stimulated secretion. Increasing evidence also suggests that CST may play a role in the regulatory mechanisms between the neuroendocrine and immune systems. The activity of CST-14 or hCST-17 in the periphery appears to be identical to that of somatostatin in humans [61], suggesting that outside the CNS, CST-14/hCST-17 binds to SST receptors. Dalm *et al.* [14] first reported the expression of prepro-cortistatin mRNA in human lymphoid tissue, immune cells and bone marrow, and this result has been confirmed in a battery of 56 human non-tumour and 108 tumour tissues [5]. High expression levels of prepro-cortistatin mRNA have been detected in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells [4]. In contrast, no somatostatin mRNA was detectable in immune cell types. In addition, both CST and SST2 mRNAs have been shown to be upregulated during differentiation of human monocytes into both macrophages and dendritic cells. Therefore, it has been proposed that in humans, CST would be an endogenous ligand of SST2 in immune cells rather than somatostatin [4].

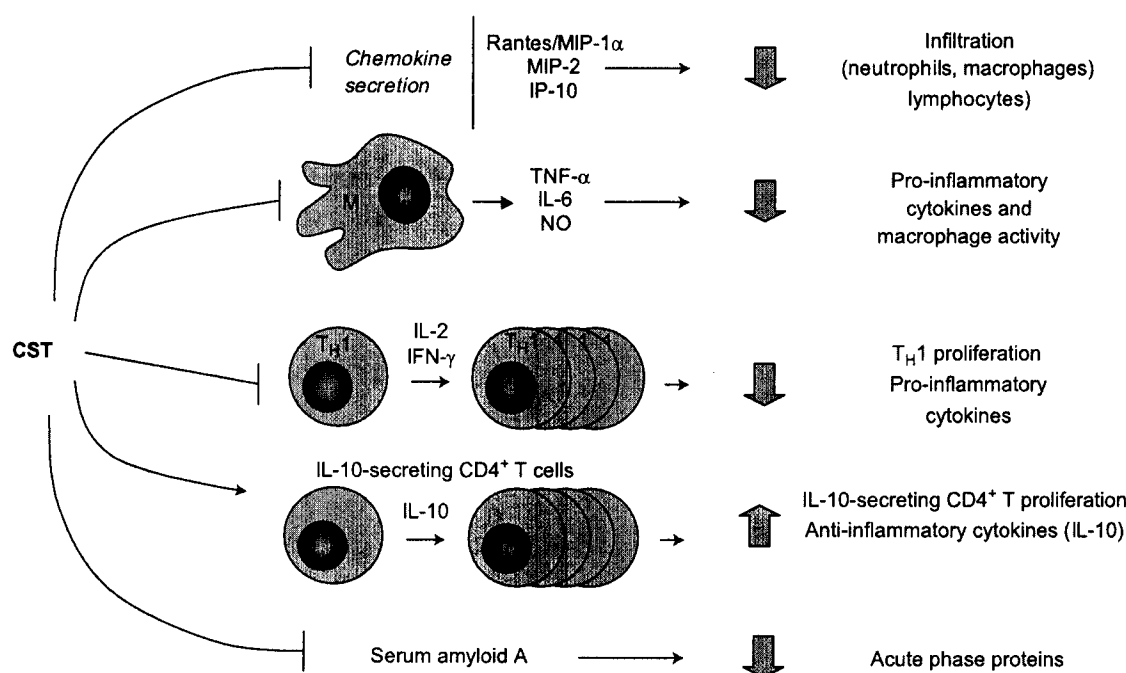
More recently, González-Rey *et al.* have shown the potential therapeutic action of CST in Crohn's disease, a bowel disease that causes chronic inflammation of the intestinal tract [62]. Intracolonic administration of trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) in mice mimics the histopathological features of the human Crohn's disease. Indeed, in the TNBS-induced murine model of colitis, CST-29 administration revealed its effectiveness by significantly improving the inflammatory disease development: recovery of body weight loss, slight colon inflammation, colitis avoidance and reduced

mortality. Interestingly, anti-inflammatory actions of both somatostatin and octreotide treatments were not as potent in ameliorating the Crohn's disease symptoms. The therapeutic effect of CST was related with its role in regulating the levels of different endogenous pro/anti-inflammatory cytokines. In addition, similar studies report more evidences in favour of the use of CST as a novel therapeutic approach for inflammatory diseases. In this case, CST-29 administration to several murine models of human septic shock syndrome protects against lethal endotoxemia [63]. CST-29 treatments were conducted on mice with cecal ligation and puncture, with injection of *Escherichia coli* or bacterial endotoxin. In all mouse models of endotoxemia, CST-29 was shown to protect against the related histopathology, such as inflammatory cell infiltration, coagulation abnormalities and inflammation in various organs. In both studies, the therapeutic effect of CST-29 was related with its role in regulating the levels of different endogenous pro/anti-inflammatory cytokines [62,63].

A possible caveat of the use of peptides as therapeutic agents is the relative chemical instability and bioavailability. Two decades of pharmacokinetic studies with somatostatin have given a wealth of information regarding the stability of natural somatostatin and its analogues [64]. Subtype-selective somatostatin receptor agonists have been synthesised, although molecules that bind to multiple receptor subtypes such as octreotide or SOM230, appear to be more effective at inhibiting cellular growth and secretion [40,65]. A newer generation of synthetic analogues is expected to be based on the unique anti-inflammatory properties of CST.

## 6. Mechanisms of the anti-inflammatory effect of cortistatin

The evidence gathered so far suggests that the anti-inflammatory activity of CST may be mediated through regulation of cytokine release, at both the antigen-presenting cell and the T-helper cell population.



**Figure 2. Model summarising the effect of CST on a wide range of mediators of the inflammatory response.** CST-29 reduces the inflammatory cell infiltrations (neutrophils, macrophages and lymphocytes) probably due to its effect on decreasing chemokine secretion (especially, RANTES/MIP-1 $\alpha$ , MIP-2 and IP-10) [62]. CST-29 was shown to decrease the levels of different pro-inflammatory cytokines, mainly TNF- $\alpha$  and IL-6 secreted by macrophages (M) and IL-2 and IFN- $\gamma$  by T<sub>H</sub>1 cells (T<sub>H</sub>1) [62]. In addition, CST-29 decreases macrophage activity (NO) *in vitro* and T<sub>H</sub>1 cell proliferation. In contrast, CST-29 increases the levels of IL-10 pro-inflammatory cytokine. This effect may be due to an increase in proliferation of either T<sub>H</sub>2 cells or, more likely, to CD4<sup>+</sup> T regulatory (T<sub>reg</sub>) cells, because IL-4, which is produced by T<sub>H</sub>2 cells, is not affected by CST-29. CST-29 decreases the concentration of an acute phase protein known as serum amyloid A [62,63]. The mechanisms proposed here could mediate the therapeutic potential of CST against several inflammatory diseases.

CST: Cortistatin; M: Macrophage; MIP: Macrophage inflammatory protein; NO: Nitric oxide; RANTES: Regulated on activation, normal T expressed and secreted.

González-Rey *et al.* have suggested the possible therapeutic mechanisms of CST against inflammatory disorders (Figure 2) [62]. The presence of inflammatory cell infiltrates is common in patients with inflammatory diseases. In both TBNS-induced colitis and endotoxemia models, histological analysis revealed the presence of infiltrations of macrophages, lymphocytes and neutrophils [62,63]. In contrast, inflammatory infiltrates were significantly reduced in mice treated with CST-29. The decreased number of infiltrates could be explained by the effect of CST-29 on chemokine levels. CST-29 was shown to reduce the secretion of a wide range of different chemokines. CST-29 mainly affected RANTES/MIP-1 $\alpha$  (chemokine for macrophages and T cells), MIP-2 (chemokine for neutrophils) and IP-10 (chemokine for T<sub>H</sub>1 cells) levels. Importantly, CST-29 reduced the levels of IFN- $\gamma$ . This cytokine is causatively involved in inflammatory bowel disease in mice, because IFN- $\gamma$  knockout mice are resistant to dextran-induced colitis [66]. CST-29 inhibited the activity of macrophages *in vitro* elicited by the decrease of NO secretion. In addition to the decreased number of infiltrated inflammatory cells,

CST-29 regulated cytokine secretion and proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells. CST-29 reduced the number of T<sub>H</sub>1 cells and its pro-inflammatory cytokine secretion (IL-2 and IFN- $\gamma$ ), whereas CST-29 enhanced the number of IL-10-secreting CD4<sup>+</sup> T cells, together with its anti-inflammatory cytokine production of IL-10. As IL-4 secretion was not enhanced, whereas IL-10 was, IL-10-secreting CD4<sup>+</sup> T cells seem not to be T<sub>H</sub>2 cells as initially thought. Thus, it has been proposed that the IL-10-secreting CD4<sup>+</sup> T cells enhanced by CST-29 are T regulatory cells (T<sub>reg</sub>). T<sub>reg</sub> cells are a subset of lymphocytes that control autoreactive T cells present in peripheral tissues. Despite the activity of T<sub>reg</sub> cells and the negative selection, uncontrolled self reactive T cell clones can exit to the periphery causing an autoimmune disease. Interestingly, autoimmune inflammatory disorders, such as bowel disease, have been related to the deletion or dysfunction of IL-10 suppressive T<sub>reg</sub> cells [67-69]. Thus, CST-29 may restore the normal activity of T<sub>reg</sub> cells in the TNBS-induced murine model of colitis. It is noteworthy that CST, besides its local anti-inflammatory effect, can reduce systemic secretion of an acute phase protein (APP) known as serum amyloid A in

both inflammatory disease models [62,63]. As acute phase proteins have been related to tissue damage [70], reduction of APP secretion may improve recovery from inflammatory diseases. Of special consideration is the reduction of APP in the murine model of septic shock due to CST-29. APP reduction could explain how coagulation abnormalities, commonly involved in septic shock pathogenesis [71], were absent in CST-29-treated mice with induced septic shock.

It is important to point out the increase in the therapeutic potential of CST in combination with other anti-inflammatory peptides. González-Rey *et al.* show that treatments with CST-29 and vasoactive intestinal peptide (VIP) to the murine model of human septic shock was more effective than treatments with only one peptide [63]. Therefore, it was shown that synergic therapeutic effects of CST-29 and VIP are probably due to activation of different signalling pathways by CST-29 and VIP. Indeed, *in vitro* pharmacological data suggest that the effects of CST are mediated through inhibiting accumulation of intracellular cAMP [1], whereas VIP receptors can couple to  $G_i$  or  $G_o$  proteins [72].

In summary, this review addresses the importance of CST in the downregulation of the inflammatory response and it raises the possibility of considering CST as a potent therapeutic agent against inflammatory disorders.

## 7. Expert opinion

CST-14 shares homology with SRIF-14 in bioactive peptide amino acid sequence, partial coexpression, activation of common receptors and signalling pathways, as well as inhibition of neuronal activity and secretion.

However, several experiments *in vivo* reveal substantial differences between the two peptides and cumulatively lead to the conclusion that CST-14 is not an alternative or 'back-up' somatostatin in the CNS. Its distribution makes CST an

interesting target for pharmacological intervention on diseases in which the cortical circuitry is impaired.

Besides the potential relevant regulatory role of somatostatin, CST could represent a major endogenous regulatory factor in the immune system. New functions for CST are expected as it appears to be an alternative ligand for somatostatin receptors in peripheral organs. *In vitro* experiments and studies with several murine models of human diseases have shown that CST-29 leads to a reduction in the pro-inflammatory response. These results reveal the potential therapeutic use of CST against inflammatory diseases. In addition to its efficacy, no side effects were observed in the mice treated with CST-29, probably due to the short duration of the treatment. However, taking into account the structural similarities between CST and somatostatin, it is likely that CST would present similar disadvantages as somatostatin for clinical use. CST is probably unstable in the circulation, limiting its therapeutic efficacy, at least for chronic treatments. In addition, its wide range of action could present unwanted side effects. Also, interspecies differences observed in the response of immune cells in murine models and humans may confound the possible therapeutic effects of CST. Despite these limitations, CST could probably be used in a multidrug therapy for increasing its therapeutic efficacy. And, the properties of CST could also be used to design a novel agonist suitable for clinical use. Although the experimental data are promising, the possible relevance of CST in the immune diseases and its therapeutic benefits in humans remain to be elucidated. Therefore, further studies of the effects of CST in human immune cells are needed.

## Acknowledgements

This work was supported by NIH grants (MH58543). Alicia Rubio was supported by a fellowship of the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

## Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (\*) or of considerable interest (\*\*) to readers.

- DE LECEA L, CRIADO JR, PROSPERO-GARCIA O *et al.*: A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* (1996) 381(6579):242-245.
- DE LECEA L, RUIZ-LOZANO P, DANIELSON P *et al.*: cDNA cloning, mRNA distribution and chromosomal mapping of mouse and human preprocortistatin. *Genomics* (1997) 42:499-506.
- TOSTIVINT H, JOLY L, LIHRMANN I *et al.*: Comparative genomics provides evidence for close evolutionary relationships between the urotensin II and somatostatin gene families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2006) 103(7):2237-2242.
- DALM VA, VAN HAGEN PM, VAN KOETSVELD PM *et al.*: Expression of somatostatin, cortistatin, and somatostatin receptors in human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* (2003) 285(2):E344-E353.
- ALLIA E, TARABRA E, VOLANTE M *et al.*: Expression of cortistatin and MrgX2, a specific cortistatin receptor, in human neuroendocrine tissues and related tumours. *J. Pathol.* (2005) 207(3):336-345.
- Expression profile of preprocortistatin mRNA and MrgX2 mRNA in a wide range of normal tissue and neuroendocrine tumours suggested that MrgX2 role is limited to specific tissues.
- DE LECEA L, CASTANO JP: Cortistatin: not just another somatostatin analog. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* (2006) 2(7):356-357.
- VEBER DF, HOLLY FW, NUTT RF *et al.*: Highly active cyclic and bicyclic somatostatin analogues of reduced ring size. *Nature* (1979) 280(5722):512-514.
- PATEL YC: Somatostatin and its receptor family. *Front. Neuroendocrinol.* (1999) 20(3):157-198.
- MOLLER LN, STIDSEN CE, HARTMANN B, HOLST JJ: Somatostatin receptors. *Biochim. Biophys. Acta* (2003) 1616(1):1-84.

10. OLIAS G, VIOLETT C, KUSSEROW H, EPELBAUM J, MEYERHOF W: Regulation and function of somatostatin receptors. *J. Neurochem.* (2004) 89(5):1057-1091.
11. CRIADO JR, LI H, JIANG X *et al.*: Structural and compositional determinants of cortistatin activity. *J. Neurosci. Res.* (1999) 56(6):611-619.
12. FUKUSUMI S, KITADA C, TAKEKAWA S *et al.*: Identification and characterization of a novel human cortistatin-like peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1997) 232(1):157-163.
13. SIEHLER S, SEUWEN K, HOYER D: [125I]Tyr10-cortistatin14 labels all five somatostatin receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (1998) 357(5):483-489.
14. DALM VA, VAN HAGEN PM, VAN KOETSVELD PM *et al.*: Cortistatin rather than somatostatin as a potential endogenous ligand for somatostatin receptors in the human immune system. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2003) 88(1):270-276.
- First report showing that precortistatin mRNA expression is differentially regulated in human lymphoid tissues and immune cells. In the immune system, CST, rather than somatostatin, seems to be an endogenous ligand in the immune system.
15. SCHWEITZER P, MADAMBA SG, SIGGINS GR: The sleep-modulating peptide cortistatin augments the h-current in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* (2003) 23(34):10884-10891.
16. AGNATI LF, FERRE S, LLUIS C, FRANCO R, FUXE K: Molecular mechanisms and therapeutic implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons. *Pharmacol. Rev.* (2003) 55(3):509-550.
17. PARAMESWARAN N, SPIELMAN WS: RAMPs: the past, present and future. *Trends Biochem. Sci.* (2006) 31(11):631-638.
18. DEGHENGI R, PAPOTTI M, GHIGO E, MUCCIOLI G: Cortistatin, but not somatostatin, binds to growth hormone secretagogue (GHS) receptors of human pituitary gland. *J. Endocrinol. Invest.* (2001) 24(1):RC1-RC3.
19. ROBAS N, MEAD E, FIDOCK M: MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion. *J. Biol. Chem.* (2003) 278(45):44400-44404.
- First report of a CST- selective receptor. This binding activity should be taken cautiously, as other studies have shown that other peptides bind MrgX2 nonselectively (see [21]).
20. KAMOHARA M, MATSUO A, TAKASAKI J *et al.*: Identification of MrgX2 as a human G-protein-coupled receptor for proadrenomedullin N-terminal peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2005) 330(4):1146-1152.
21. NOTHACKER HP, WANG Z, ZENG H *et al.*: Proadrenomedullin N-terminal peptide and cortistatin activation of MrgX2 receptor is based on a common structural motif. *Eur. J. Pharmacol.* (2005) 519(1-2):191-193.
22. REUBI JC, HORISBERGER U, WASER B, GEBBERS JO, LAISSUE J: Preferential location of somatostatin receptors in germinal centers of human gut lymphoid tissue. *Gastroenterology* (1992) 103(4):1207-1214.
23. FERONE D, BOSCHETTI M, RESMINI E *et al.*: Neuroendocrine-immune interactions: the role of cortistatin/somatostatin system. *Ann. NY Acad. Sci.* (2006) 1069:129-144.
- The role of CST and somatostatin in the thymus is presented as a paradigm of neuroendocrine-immune interactions, focusing on tumour diagnostic procedures of somatostatin analogues.
24. VAN HAGEN PM, KRENNING EP, KWEKKEBOOM DJ *et al.*: Somatostatin and the immune and haematopoietic system; a review. *Eur. J. Clin. Invest.* (1994) 24(2):91-99.
- The role of somatostatin and SST receptors in immune system is revised and the therapeutic benefits of somatostatin and octreotide in oncology are discussed.
25. LICHTENAUER-KALIGIS EG, DALM VA, OOMEN SP *et al.*: Differential expression of somatostatin receptor subtypes in human peripheral blood mononuclear cell subsets. *Eur. J. Endocrinol.* (2004) 150(4):565-577.
26. ELLIOTT DE, LI J, BLUM AM *et al.*: SSTR2A is the dominant somatostatin receptor subtype expressed by inflammatory cells, is widely expressed and directly regulates T cell IFN-gamma release. *Eur. J. Immunol.* (1999) 29(8):2454-2463.
27. LANG A, SAKHNINI E, FIDDER HH *et al.*: Somatostatin inhibits pro-inflammatory cytokine secretion from rat hepatic stellate cells. *Liver Int.* (2005) 25(4):808-816.
28. ELLIOTT DE, METWALI A, BLUM AM *et al.*: T lymphocytes isolated from the hepatic granulomas of schistosome-infected mice express somatostatin receptor subtype II (SSTR2) messenger RNA. *J. Immunol.* (1994) 153(3):1180-1186.
29. CHATTERJEE S, VROLIX G, DEPOORTERE I, PEETERS T, VAN MARCK E: The therapeutic effect of the neuropeptide hormone somatostatin on *Schistosoma mansoni* caused liver fibrosis. *BMC Infect. Dis.* (2005) 5(1):45.
30. NIEDERMUHLBICHLER M, WIEDERMANN CJ: Suppression of superoxide release from human monocytes by somatostatin-related peptides. *Regul. Pept.* (1992) 41(1):39-47.
31. WIEDERMANN CJ, REINISCH N, BRAUNSTEINER H: Stimulation of monocyte chemotaxis by human growth hormone and its deactivation by somatostatin. *Blood* (1993) 82(3):954-960.
32. RYU SY, JEONG KS, YOON WK *et al.*: Somatostatin and substance P induced *in vivo* by lipopolysaccharide and in peritoneal macrophages stimulated with lipopolysaccharide or interferon-gamma have differential effects on murine cytokine production. *Neuroimmunomodulation* (2000) 8(1):25-30.
33. KANG BN, JEONG KS, PARK SJ *et al.*: Regulation of apoptosis by somatostatin and substance P in peritoneal macrophages. *Regul. Pept.* (2001) 101(1-3):43-49.
34. AHMED AA, WAHBI A, NORDLIND K *et al.*: *In vitro* Leishmania major promastigote-induced macrophage migration is modulated by sensory and autonomic neuropeptides. *Scand. J. Immunol.* (1998) 48(1):79-85.
35. EPELBAUM J, AGID F, AGID Y *et al.*: Somatostatin receptors in brain and pituitary. *Horm. Res.* (1989) 31(1-2):45-50.
36. GRIMALDI M, FLORIO T, SCHETTINI G: Somatostatin inhibits interleukin 6 release from rat cortical Type I astrocytes via the inhibition of adenylyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1997) 235(1):242-248.
37. FEINDT J, SCHMIDT A, MENTLEIN R: Receptors and effects of the inhibitory neuropeptide somatostatin in microglial cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* (1998) 60(2):228-233.

38. REUBI JC, WASER B, SCHAER JC, LAISSUE JA: Somatostatin receptor SST1-SST5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur. J. Nucl. Med.* (2001) 28(7):836-846.
39. KERI G, MEZO I, VADASZ Z *et al.*: Structure-activity relationship studies of novel somatostatin analogs with antitumor activity. *Pept. Res.* (1993) 6(5):281-288.
40. WECKBECKER G, BRINER U, LEWIS I, BRUNS C: SOM230: a new somatostatin peptidomimetic with potent inhibitory effects on the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in rats, primates, and dogs. *Endocrinology* (2002) 143(10):4123-4130.
41. NEWMAN CB, MELMED S, GEORGE A *et al.*: Octreotide as primary therapy for acromegaly. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1998) 83(9):3034-3040.
42. DE HERDER WW, HOFLAND LJ, VAN DER LELY AJ, LAMBERTS SW: Somatostatin receptors in gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr. Relat. Cancer* (2003) 10(4):451-458.
43. AVGERINOS A, NEVENS F, RAPTIS S, FEVERY J: Early administration of somatostatin and efficacy of sclerotherapy in acute oesophageal variceal bleeds: the European Acute Bleeding Oesophageal Variceal Episodes (ABOVE) randomised trial. *Lancet* (1997) 350(9090):1495-1499.
44. DE HERDER WW, LAMBERTS SW: Somatostatin and somatostatin analogues: diagnostic and therapeutic uses. *Curr. Opin. Oncol.* (2002) 14(1):53-57.
45. LAMBERTS SW, KRENNING EP, REUBI JC: The role of somatostatin and its analogs in the diagnosis and treatment of tumors. *Endocr. Rev.* (1991) 12(4):450-482.
- An authoritative review that describes the clinical applications of somatostatin and synthetic SST receptor agonists against pituitary adenomas and gastroenteropancreatic tumours.
46. SCARPIGNATO C, PELOSINI I: Somatostatin analogs for cancer treatment and diagnosis: an overview. *Chemotherapy* (2001) 47(Suppl. 2):1-29.
47. DASGUPTA P: Somatostatin analogues: multiple roles in cellular proliferation, neoplasia, and angiogenesis. *Pharmacol. Ther.* (2004) 102(1):61-85.
48. KRENNING EP, DE JONG M, KOOIJ PP *et al.*: Radiolabelled somatostatin analogue(s) for peptide receptor scintigraphy and radionuclide therapy. *Ann. Oncol.* (1999) 10(Suppl. 2):S23-S29.
49. UR E, BOMANJI J, MATHER SJ *et al.*: Localization of neuroendocrine tumours and insulinomas using radiolabelled somatostatin analogues, 123I-Tyr3-octreotide and 111In-pentatreotide. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* (1993) 38(5):501-506.
50. REUBI JC, MAZZUCHELLI L, LAISSUE JA: Intestinal vessels express a high density of somatostatin receptors in human inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* (1994) 106(4):951-959.
51. VANHAGEN PM, MARKUSSE HM, LAMBERTS SW *et al.*: Somatostatin receptor imaging. The presence of somatostatin receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* (1994) 37(10):1521-1527.
52. VANHAGEN PM, KRENNING EP, REUBI JC *et al.*: Somatostatin analogue scintigraphy in granulomatous diseases. *Eur. J. Nucl. Med.* (1994) 21(6):497-502.
53. RAUCA C, SCHAFER K, HOLLT V: Effects of somatostatin, octreotide and cortistatin on ischaemic neuronal damage following permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (1999) 360(6):633-638.
54. SANCHEZ-ALAVEZ M, GOMEZ-CHAVARIN M, NAVARRO L *et al.*: Cortistatin modulates memory processes in rats. *Brain Res.* (2000) 858(1):78-83.
55. TALLENT MK, FABRE V, QIU C *et al.*: Cortistatin overexpression in transgenic mice produces deficits in synaptic plasticity and learning. *Mol. Cell. Neurosci.* (2005) 30(3):465-475.
56. WINSKY-SOMMERER R, SPIER AD, FABRE V, DE LECEA L, CRIADO JR: Overexpression of the human  $\beta$ -amyloid precursor protein downregulates cortistatin mRNA in PDAPP mice. *Brain Res.* (2004) 1023(1):157-162.
57. LI WG, GAVRILA D, LIU X *et al.*: Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor- $\kappa$ B activation in human endothelial cells. *Circulation* (2004) 109(18):2221-2226.
58. GRANADO M, PRIEGO T, MARTIN AI, VILLANUA MA, LOPEZ-CALDERON A: Anti-inflammatory effect of the ghrelin agonist growth hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in arthritic rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* (2005) 288(3):E486-E492.
59. LUQUE RM, PEINADO JR, GRACIA-NAVARRO F *et al.*: Cortistatin mimics somatostatin by inducing a dual, dose-dependent stimulatory and inhibitory effect on growth hormone secretion in somatotropes. *J. Mol. Endocrinol.* (2006) 36(3):547-556.
60. BROGLIO F, KOETVELD PV P, BENSO A *et al.*: Ghrelin secretion is inhibited by either somatostatin or cortistatin in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2002) 87(10):4829-4832.
61. GOTTERO C, PRODAM F, DESTEFANIS S *et al.*: Cortistatin-17 and -14 exert the same endocrine activities as somatostatin in humans. *Growth Horm. IGF Res.* (2004) 14(5):382-387.
62. GONZALEZ-REY E, VARELA N, SHEIBANIE AF *et al.*: Cortistatin, an antiinflammatory peptide with therapeutic action in inflammatory bowel disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2006) 103(11):4228-4233.
- Potential therapeutic action of CST in Crohn's disease is demonstrated in a murine model of induced colitis. The mechanisms of CST anti-inflammatory effect is suggested.
63. GONZALEZ-REY E, CHORNY A, ROBLEDO G, DELGADO M: Cortistatin, a new antiinflammatory peptide with therapeutic effect on lethal endotoxemia. *J. Exp. Med.* (2006) 203(3):563-571.
- CST treatments to several murine models of human septic shock syndrome are shown to protect against lethal endotoxemia.
64. WECKBECKER G, LEWIS I, ALBERT R *et al.*: Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat. Rev. Drug Discov.* (2003) 2(12):999-1017.
- Excellent review of the role of somatostatin and SST receptor agonists in both physiological and pathological conditions. The potential therapeutic benefits of somatostatin and SST receptor agonists are discussed.

65. LEWIS I, BAUER W, ALBERT R *et al.*: A novel somatostatin mimic with broad somatotropin release inhibitory factor receptor binding and superior therapeutic potential. *J. Med. Chem.* (2003) 46(12):2334-2344.
66. ITO R, SHIN-YA M, KISHIDA T *et al.*: Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Clin. Exp. Immunol.* (2006) 146(2):330-338.
67. THOMPSON C, POWRIE F: Regulatory T cells. *Curr. Opin. Pharmacol.* (2004) 4(4):408-414.
68. SINGH B, READ S, ASSEMAN C *et al.*: Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol. Rev.* (2001) 182:190-200.
69. GROUX H, O'GARRA A, BIGLER M *et al.*: A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* (1997) 389(6652):737-742.
70. UHLAR CM, WHITEHEAD AS: Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur. J. Biochem.* (1999) 265(2):501-523.
71. NETEA MG, VAN DER MEER JW, VAN DEUREN M, KULLBERG BJ: Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? *Trends Immunol.* (2003) 24(5):254-258.
72. DICKSON L, ARAMORI I, SHARKEY J, FINLAYSON K: VIP and PACAP receptor pharmacology: a comparison of intracellular signaling pathways. *Ann. NY Acad. Sci.* (2006) 1070:239-242.
73. FIORAVANTI A, GOVONI M, LA MONTAGNA G *et al.*: Somatostatin 14 and joint inflammation: evidence for intraarticular efficacy of prolonged administration in rheumatoid arthritis. *Drugs Exp. Clin. Res.* (1995) 21(3):97-103.
74. CHOWERS Y, CAHALON L, LAHAV M *et al.*: Somatostatin through its specific receptor inhibits spontaneous and TNF- $\alpha$ - and bacteria-induced IL-8 and IL-1 $\beta$  secretion from intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* (2000) 165(6):2955-2961.
75. ELIAKIM R, KARMELI F, OKON E, RACHMILEWITZ D: Octreotide effectively decreases mucosal damage in experimental colitis. *Gut* (1993) 34(2):264-269.
76. CASCINU S, FEDELI A, FEDELI SL, CATALANO G: Control of chemotherapy-induced diarrhea with octreotide. A randomized trial with placebo in patients receiving cisplatin. *Oncology* (1994) 51(1):70-73.
77. BEAUGERIE L, BAUMER P, CHAUSSADE S *et al.*: Treatment of refractory diarrhoea in AIDS with acetorphan and octreotide: a randomized crossover study. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* (1996) 8(5):485-489.
78. BOEHM BO, LANG GK, JEHLE PM, FELDMAN B, LANG GE: Octreotide reduces vitreous hemorrhage and loss of visual acuity risk in patients with high-risk proliferative diabetic retinopathy. *Horm. Metab. Res.* (2001) 33(5):300-306.
79. KARALIS K, MASTORAKOS G, CHROUSOS GP, TOLIS G: Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction *in vivo*. *J. Clin. Invest.* (1994) 93(5):2000-2006.
- Octreotide and lanreotide treatments are shown to protect rats against inflammatory disorders due to its effect on various inflammatory mediators.
80. KRASSAS GE, DOUMAS A, KALTSAS T, HALKIAS A, PONTIKIDES N: Somatostatin receptor scintigraphy before and after treatment with somatostatin analogues in patients with thyroid eye disease. *Thyroid* (1999) 9(1):47-52.
81. KRASSAS GE, PONTIKIDES N, DOUKIDIS D, HEUFELDER G, HEUFELDER AE: Serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$ , soluble intercellular adhesion molecule-1, soluble vascular cell adhesion molecule-1, and soluble interleukin-1 receptor antagonist in patients with thyroid eye disease undergoing treatment with somatostatin analogues. *Thyroid* (2001) 11(12):1115-1122.
82. HELYES Z, PINTER E, NEMETH J *et al.*: Anti-inflammatory effect of synthetic somatostatin analogues in the rat. *Br. J. Pharmacol.* (2001) 134(7):1571-1579.
83. PINTER E, HELYES Z, NEMETH J *et al.*: Pharmacological characterisation of the somatostatin analogue TT-232: effects on neurogenic and non-neurogenic inflammation and neuropathic hyperalgesia. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (2002) 366(2):142-150.
84. HELYES Z, SZABO A, NEMETH J *et al.*: Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. *Arthritis Rheum.* (2004) 50(5):1677-1685.

# Affiliation

Alicia Rubio<sup>1</sup>, Jesús Ávila<sup>1</sup> PhD  
& Luis de Lecea<sup>1,2</sup> PhD

<sup>†</sup>Author for correspondence

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Madrid,  
Centro de Biología Molecular, Madrid, Spain  
<sup>2</sup>Stanford University, Department of Psychiatry  
and Behavioural Sciences, 701B Welch Road,  
Palo Alto, Stanford, CA 94304, USA  
Tel: +1 650 736 9039; Fax: +1 650 736 9528;  
E-mail: llecea@stanford.edu





## Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells

A. Gómez-Ramos,<sup>a</sup> M. Díaz-Hernández,<sup>b</sup> A. Rubio,<sup>a</sup> M.T. Miras-Portugal,<sup>b</sup> and J. Avila<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, C/Nicolás Cabrera n°1, Campus de Cantoblanco, 28049, Madrid, Spain

<sup>b</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>c</sup>CIBERNED, Spanish Ministry of Health, Spain

Received 19 October 2007; revised 27 November 2007; accepted 6 December 2007

Available online 15 December 2007

**Extracellular tau promotes an increase in the level of intracellular calcium in cultured neuronal cells. We have found that such increase is impaired in the presence of antagonists of muscarinic receptors. In order to identify the nature of those receptors, we have tested the effect of different specific muscarinic receptor antagonists on tau promoted calcium increase. Our results indicate that the increase does not take place in the presence of antagonists of muscarinic (mainly M1 and M3) receptors. A similar increase in intracellular calcium was found in non-neuronal cells transfected with cDNA of M1 and M3 muscarinic receptors when tau was added. These results suggest that observed effect of tau protein on neuronal (neuroblastoma and primary cultures of hippocampal and cortical neurons) cells is through M1 and M3 muscarinic receptors. Therefore blocking M1 and for M3 receptors, by using specific receptor antagonists, can prevent that tau toxic effect that could take place in tauopathies.**

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Tau protein; Muscarinic receptors; Alzheimer disease

### Introduction

Alzheimer disease (AD) is characterized by the presence in the brain of the patients of two structures, the senile plaques and neurofibrillary tangles (NFT). The main component of NFTs is the microtubule associated protein tau in hyperphosphorylated form. Tau pathology in AD follows a reproducible pattern, whereby hyperphosphorylated (and aggregated) tau first appears in the entorhinal cortex and hippocampus, and from there, the pathology spreads to the

surrounding areas (Braak and Braak, 1991). In this pathological process there is neuron death and as a consequence of this, intracellular components like tau in soluble form or forming NFT could be found at the extracellular space, becoming ghost tangles.

It has been proposed that extracellular tau could be toxic for neurons (Gomez-Ramos et al., 2006), playing a role in the spreading pathology of AD. The possibility exists that tau toxicity could be dependent on the interaction of this protein with cellular receptors able to promote an increase in intracellular calcium levels. It has been previously indicated that not only tau protein but others related with neurodegenerative disorders such as  $\alpha$ -synuclein (Danzer et al., 2007),  $\beta$ -amyloid peptide or prion protein (Demuro et al., 2005) may induce a disruption of calcium homeostasis when added to cultured neuronal cells. However, the mechanisms for that disruption of calcium homeostasis, differ with the type of assayed protein (Adamczyk and Strosznajder, 2006; Danzer et al., 2007; Gomez-Ramos et al., 2006). In the case of tau protein it has been suggested that changes in the level of intracellular calcium could be mediated by the interaction of tau with muscarinic receptors, that induce calcium release from intracellular stores (Gomez-Ramos et al., 2006).

There are five cholinergic muscarinic receptor subtypes (M1 to M5), all of them being expressed in the Central Nervous System (CNS), but at different levels and in different locations, for example, M1 and M3 appear to be the most abundant muscarinic receptors expressed in hippocampus and entorhinal cortex in adult mouse, whereas M5 is poorly expressed (data from Allen Brain Atlas; <http://www.brain-map.org/>). The M1–M5 receptors can be subdivided into two major functional classes according to their G-protein coupling preference. The M1, M3 and M5 receptors, selectively couple to G-proteins of the  $G_q/G_{11}$  family, whereas the M2 and M4 receptors preferentially activate  $G_i/G_o$ -type G-proteins (Wess et al., 2007). Coupling through the first group (M1, M3 and M5), but not through the second group, results in an increase in intracellular calcium (Lanzafame et al., 2003).

In this work, we tried to identify the muscarinic receptor or receptors involved in the response of neuronal cells to extracellular

\* Corresponding author. Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, C/Nicolás Cabrera n°1, Campus de Cantoblanco, 28049, Madrid, Spain. Fax: +34 1964420.

E-mail address: [javila@cbm.uam.es](mailto:javila@cbm.uam.es) (J. Avila).

Available online on ScienceDirect ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)).

tau. Using pharmacological tools and transfected cells with cDNA of muscarinic receptors, we have determined that M1 and M3 muscarinic receptors are involved in this cellular response to tau, whereas M2 did not play any role in tau-induced increase in intracellular calcium. In addition, we have also found that tau induced a sustained intracellular calcium increase in primary cultures of hippocampal and cortical neurons.

## Results

### *Exposure to tau deregulates calcium homeostasis in SH-SY5Y neuroblastoma cells, but not in the presence of atropine*

The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line is a well characterized model to study muscarinic cholinergic function (Lambert and Nahorski, 1990; Murphy et al., 1991) and we decided to use this cellular model to establish the effect that extracellular tau induces on cholinergic neurotransmission system.

In order to check the functional status of these cells, FURA-2 AM loaded SH-SY5Y cells were exposed to 50  $\mu$ M ACh (Fig. 1A a). The calcium increase induced by ACh was totally abolished when SH-SY5Y cells were pretreated with 100  $\mu$ M atropine, a broad muscarinic receptor antagonist (Fig. 1A b). These data suggest that muscarinic are the main cholinergic receptors in this cell line.

Fig. 1B a shows the effect of adding recombinant tau to FURA-2 loaded SH-SY5Y, with a low number of passages (minor than 10). The addition of tau in calcium dependent fluorescence was similar to that found for ACh in these cells; this effect was totally abolished when SH-SY5Y cells were pre-incubated with atropine (Fig. 1B b). This result suggests that the increase in calcium provoked by tau, may be mediated by muscarinic acetylcholine receptors. Nevertheless, when the same experiment was repeated with SH-SY5Y cells with a higher number of passages (>10) (Fig. 1C a), the calcium signaling provoked by tau was more prolonged in time than in the case of cells with a lower number of passages. Also, in this case, the increase in intracellular calcium signaling due to tau addition was abolished when the cells were pre-incubated with 100  $\mu$ M atropine (Fig. 1C b). This difference in calcium signaling provoked by tau addition can be due to a differential expression of acetylcholine muscarinic receptors in these cells that could depend on the number of cell passages (see below). Also, Fig. 1 indicates a different calcium fluorescence response for ACh and for tau, being more prolonged in time the tau effect than ACh effect.

### *Characterization of the muscarinic receptors present in SH-SY5Y neuroblastoma cells*

As a first step to determine the type(s) of muscarinic receptor involved in tau effect, we have analyzed the expression levels of these receptors in SH-SY5Y neuroblastoma cells by using quantitative RT-PCR in different cell passages. In Fig. 2 it is shown that M1, M2, M3 and M4 receptors; and, in a much lower proportion, M5 are expressed in those neuroblastoma cells. However, we have also found that such expression could slightly change depending on the time of culture of these cells, since after more than 10 culture passages, a decrease in the expression of M2 and an increase in that of M3 and M4 was found. These results strongly suggest that the differences in the intracellular calcium induced by tau on SH-SY5Y depends on the number of days in culture and on the type and levels of muscarinic receptors expressed in these cells.

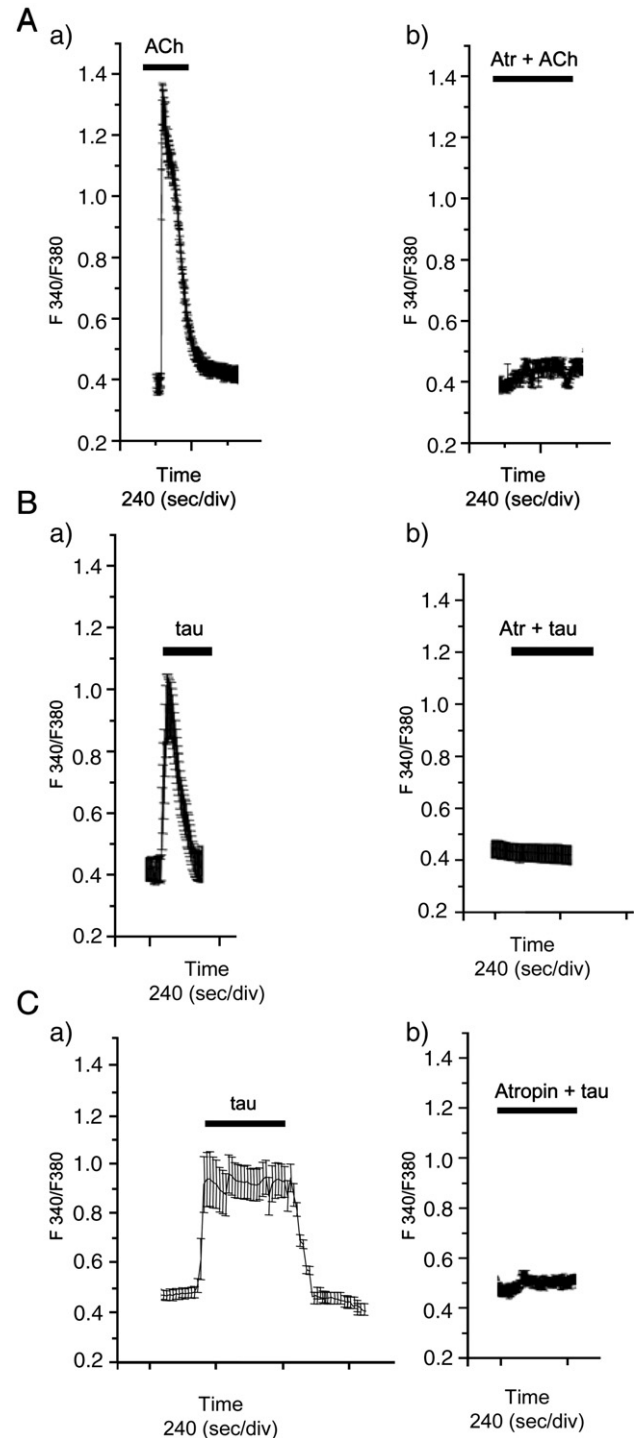


Fig. 1. Muscarinic receptor antagonist atropine, inhibits the intracellular calcium increase induced by tau protein addition. (A) FURA-2 fluorescence time course changes recorded for cultured human neuroblastoma SH-SY5Y cells, which were stimulated with 50  $\mu$ M acetylcholine (ACh) in the absence (a) or in the presence (b) of 100  $\mu$ M atropine. Upper solid bars indicate the stimulation periods. (B) FURA-2 fluorescence time course changes recorded for cultured SH-SY5Y cells with a number of passages lower than 10, stimulated with 1  $\mu$ M tau protein in the absence (a) or in the presence (b) of 100  $\mu$ M atropine. (C) As in panel B, but in this case, the SH-SY5Y cells assayed have more than 10 passages when they were used. The trace shows the average response of  $\geq 20$  cells. Bars indicate standard deviation. In all cases the upper solid bars indicate the stimulation periods.

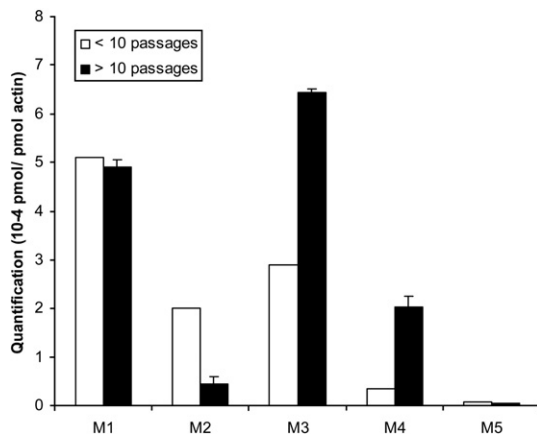


Fig. 2. Changes in the levels of expression of muscarinic receptors in SH-SY5Y human neuroblastoma cells during the culture days. Muscarinic receptor expression in SH-SY5Y neuroblastoma cells with less ( $\square$ ) or more ( $\blacksquare$ ) than 10 passages, was analyzed by Real-time PCR, and the obtained results are shown.

#### Pharmacological analysis to determine the muscarinic receptors involved in tau effect

Since the calcium deregulation induced by tau was prevented by the presence of atropine, a broad antagonist of all muscarinic receptor subtypes (Fig. 1), we decided to perform a pharmacological characterization of muscarinic receptor subtype involved in this phenomenon. For this, we used a battery of selective muscarinic receptor subtype antagonists. Thus, we used Pirenzepine to block the M1 muscarinic receptor (Rosati et al., 1999), Gallamine as M2 receptor antagonist (Gnagey et al., 1999) and 4-DAMP as M3 muscarinic receptor antagonist (Fritz et al., 2005). The results obtained in these studies showed that muscarinic receptors M1 and M3 appear to be the ones involved in the calcium deregulation induced by tau, since both Pirenzepine and 4-DAMP, but not Gallamine, inhibited the calcium increase evoked by tau stimulation (Fig. 3).

#### Transfection of non-neuronal cells with cDNA expressing M1 and M3 receptors

To confirm the previous pharmacological data, we decided to perform a new set of functional experiments using a cell heterologous expression system for M1 and M3 muscarinic receptors in COS-7 cells. Thus we first measured the expression of muscarinic receptors in these cells by Real-time PCR, and essentially, no expression, compared to that found in neuroblastoma cells was observed (data not shown). To analyze if COS-7 is a good model to test muscarinic function, transient transfection experiments were done. First, we transfected COS-7 cells

with pcDNA3.1 empty plasmid (without any cDNA insert), and we found that there was no response to ACh or tau, in those transfected cells (see below, Fig. 5A).

Then, we did a transient transfection using cDNA expressing M1 and/or M3 receptors. Fig. 4 shows the expression of these receptors by western blot (Fig. 4A). Moreover immunological studies using an antibody raised against the tag (HA) of these proteins; or by confocal

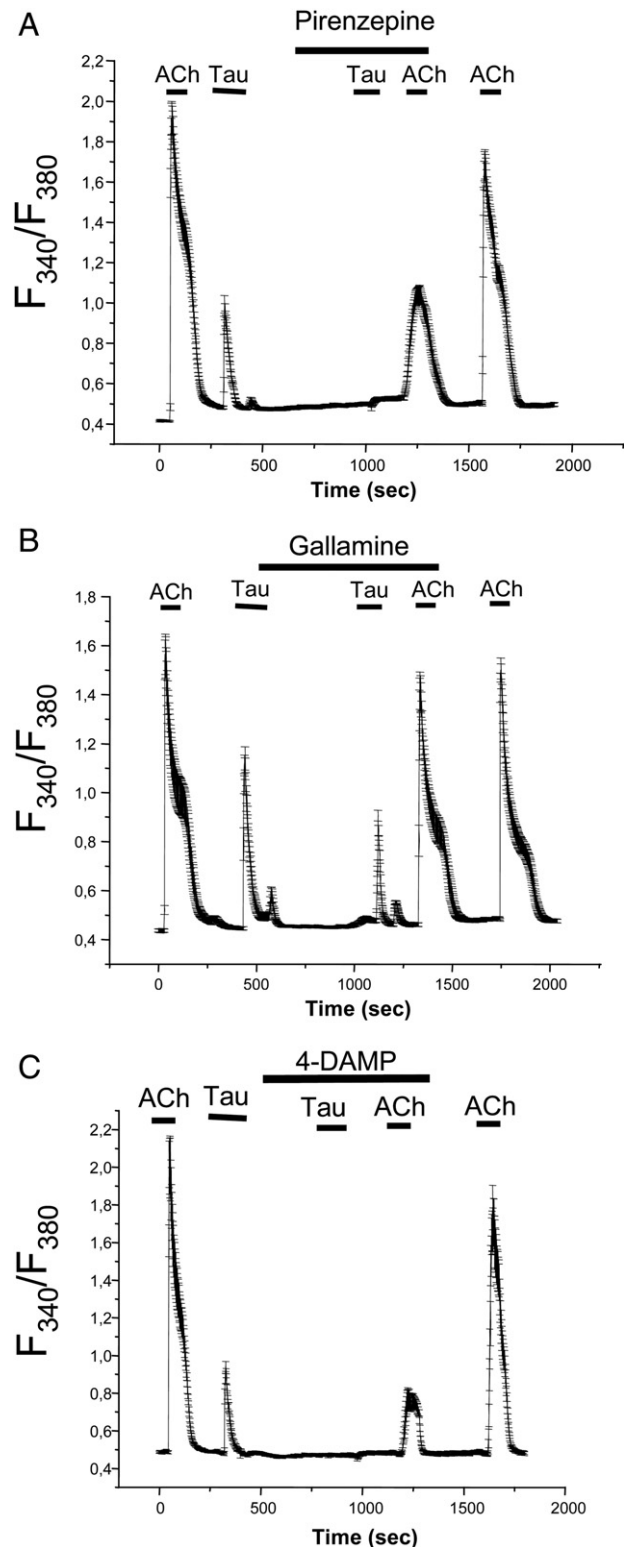


Fig. 3. Pharmacological identification of muscarinic receptor subtypes present in SH-SY5Y cells sensitive to tau stimulation. FURA-2 loaded SH-SY5Y cells were stimulated to 1  $\mu$ M tau protein in the presence of several muscarinic receptor antagonists: (A) FURA-2 fluorescence time course changes recorded for SH-SY5Y after they were stimulated with ACh and tau in the absence or presence of muscarinic receptor antagonist Pirenzepine (that inhibits M1 receptor). Finally, after washing the cells, 50  $\mu$ M ACh was applied to confirm the viability of the cells. (B) The same sequential application as in (A), but in this case tau and ACh were applied in the presence of the M2 muscarinic receptor antagonist Gallamine. (C) As in panel B, but using muscarinic receptor antagonist M3 4-DAMP. The trace shows the average response of  $\geq 20$  cells. Bars indicate standard deviation. In all cases the upper solid bars indicate the stimulation periods.

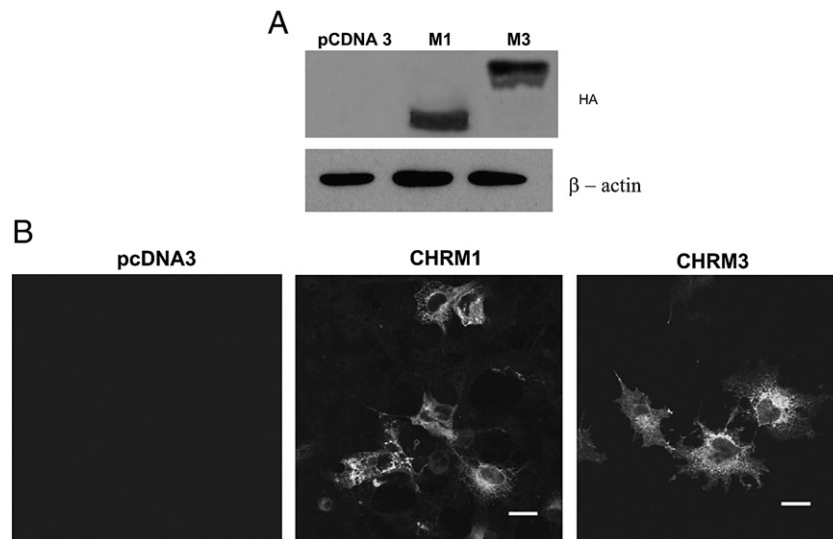


Fig. 4. Transient transfection of COS-7 cells with plasmids containing cDNAs of muscarinic receptors M1 or M3. African green monkey kidney cells COS-7 were transfected with pcDNA3 (empty vector, used as control. CHRM1 (containing full-length human muscarinic acetylcholine receptor 1 cDNA under CMV promoter and 3x HA tag in its N-terminus) and CHRM3 (similar to CHRM1 but, in this case, containing full-length human muscarinic acetylcholine receptor 3 cDNA). (A) Western blot for anti-HA and anti- $\beta$ -actin from extracts of COS-7 transiently transfected cells with pcDNA, CHRM1 and CHRM3 was done. (B) Confocal image from COS-7 transiently transfected cells with pcDNA3, CHRM1 and CHRM3.

immunofluorescence analysis (Fig. 4B) were also performed, and the expression of these receptors in transfected cells was also observed. No expression was found in the negative control of cells transfected with pcDNA3.1, empty plasmid without any cDNA insert.

When tau protein was added to M1 or M3 expressing cells (Figs. 5B, C) a clear increase in intracellular calcium concentration was found in both cases. Similar results were observed in double M1/M3 transfected cells (Fig. 5D).

After confirming that activation of M3 muscarinic receptor mediates the intracellular calcium increase evoked by tau, we wanted to know which region of tau protein was involved in the muscarinic receptor-dependent intracellular calcium increase. Thus different tau fragments (from N- to C-terminal regions) were assayed in the COS cell model expressing M3 receptor (Fig. 6A). Fig. 6B shows that mainly the tau fragment 3RC is involved in this effect. To have a further analysis of that observation we have tested if a tau peptide, located at the C-terminal region, and comprising residues 391 to 407 may have any effect on calcium response induced by tau in neuroblastoma cells. Fig. 6C shows, indeed, that such tau peptide may be involved in the effect found for the whole tau molecule.

#### *Exposure to tau deregulates calcium homeostasis in primary cultured hippocampal neurons*

Tau protein was added to hippocampal or cortical neurons in culture, and intracellular calcium increase was measured in the presence or absence of atropine. Neurons from hippocampus (Fig. 7) were cultured for different days (1, 3 and 7). After one day of culture, day in vitro 1 (DIV 1), less than 20% of the cells respond to either ACh or tau protein. However, after DIV3, and mainly after DIV7, the proportion of cells responding to both ACh and tau protein was clearly increased (Fig. 7B). It is worth highlighting that a higher sensitivity to tau (Fig. 7A) correlates with the increase in the number of neurons expressing M1 receptors (Fig. 7D). As expected, the calcium increase evoked by tau was, in all cases, prevented by atropine pretreatment (Fig. 7C). A potassium dependent depolarization was performed in all

studied neurons to confirm that the cells remain functional after the different treatments (Fig. 7C). Similar results were observed on cortical neurons in culture (data not shown).

A difference between ACh and tau responses is that tau response is more prolonged in time than ACh effect, and it could be more toxic for the cell.

#### **Discussion**

Thirty years ago, it was described that Alzheimer disease was associated with a severe loss of cholinergic markers in the brain (Bowen et al., 1976; Davies and Maloney, 1976). This observation raised the hypothesis suggesting that cholinergic loss could be related to the severity of the dementia (Perry et al., 1981) and settled the basis for the cholinergic deficit hypothesis in Alzheimer disease (Coyle et al., 1983). However, studies of other pathological features of the disease, such as the presence of senile plaques and the neurofibrillary tangles, have resulted in the formulation of new hypothesis, mainly related with the main component of senile plaques, the amyloid peptide (Hardy and Selkoe, 2002). In comparison with the very high number of publications on amyloid pathology little was done concerning a possible relationship between cholinergic deficits and the pathological features, (for a review see (Mesulam, 2004).

The main component of neurofibrillary tangles is tau protein and, in AD, tau pathology starts at the entorhinal cortex (EC) (Braak and Braak, 1991). In the EC up to 80% of cholinergic axons can be depleted in AD (Geula and Mesulam, 1996) and that depletion has been assigned to neurofibrillary degeneration (Geula and Mesulam, 1999). In the nearby areas, the presence of some muscarinic receptors, such as M2 receptors, was reduced in AD (Mash et al., 1985).

The results of this work are compatible with our previous observation (Gómez-Ramos et al., 2006) suggesting that tau found at the extracellular space, after cell death, could be toxic for neuronal cells and, upon death of the tau-responding cells, the toxicity could propagate to other neighboring cells, and this could be one of the mechanisms to explain the propagation pattern observed for tau



pathology in AD, if the process starts at EC. Indeed, working on SH-SY5Y human neuroblastoma cells, we have found that tau-induced pathology involves a deregulation of calcium homeostasis, that takes place in those cells bearing muscarinic receptors (Gómez-Ramos et al., 2006). The existence of proteins that could activate cholinergic receptors is not a new idea since it has been reported that a rabies virus glycoprotein specifically binds to acetylcholine muscarinic receptors (Kumar et al., 2007).

As a first step to identify the muscarinic receptor able to bind tau, we have identified the muscarinic receptors expressed in SH-SY5Y neuroblastoma cells, and we found that mainly M1, M2 and M3 were expressed. Thus, we propose that SH-SY5Y cells can be a good model for studying tau effect, because M1 receptor is heavily expressed in whole brain (<http://www.brain-map.org/>) including those regions mainly affected in AD. Besides, a reduction of M2 receptor expression in AD has been described (Mash et al., 1985), and finally, M3 receptors are mainly located on cortex, hippocampus, and retrohippocampal formation (<http://www.brain-map.org/>). Thus, we have focused our studies in these receptors.

After performing pharmacological studies and cDNA transfection analyses, we found a possible role for M1 and for M3, but not for M2, in tau toxicity in neuroblastoma or non-neuronal transfected cells.

Additionally, it has been shown that M1 and M3 mediated muscarinic stimulation promotes the processing of amyloid precursor protein (APP) by the  $\alpha$ -secretase pathway (Nitsch et al., 1992). However, M1 stimulation may also lead to an increase in BACE (APP  $\beta$ -secretase) expression, whereas M2 stimulation decreases BACE expression (Zuchner et al., 2004; Zuchner et al., 2005). In AD, an increase of M1 and M3 receptors with respect to that of M2 has been found (Mash et al., 1985). Thus, tau protein acting through M1 and M3 but not through M2 receptor could act on those sick neurons. In our studies we do not know, at the present, the possible difference for tau or ACh activation of muscarinic receptors and if they could be related, or not, to any of the previous consequences that have been described for muscarinic receptor activation. Nevertheless, since changes in  $\alpha$  or  $\beta$  APP secretase activities could take place upon M1/M3 receptor activation that could result in the depletion of A $\beta$  production, we are currently testing if a possible overexpression of A $\beta$  due to tau toxicity may take place and comparing it to the effect of M1/

M3 activation by ACh. However, our on-going research on M1/M3 receptor and APP transfected cells, does not suggest any difference between the addition of ACh and that of tau to the cells.

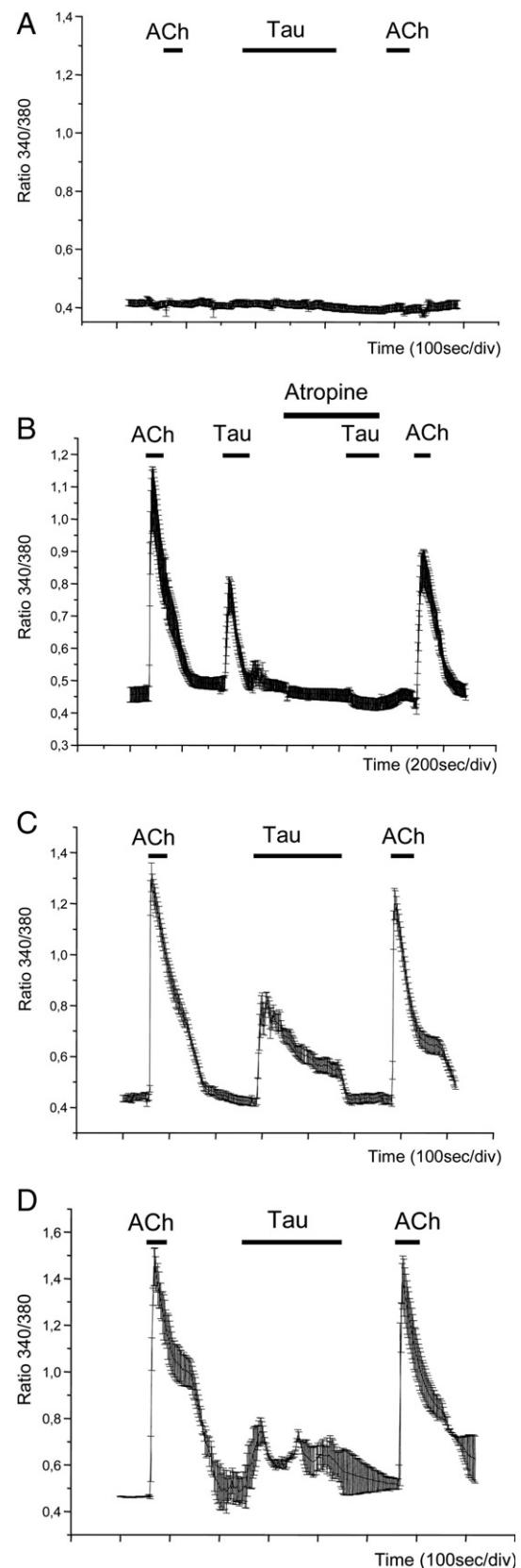


Fig. 5. Tau protein induces intracellular calcium increase in COS-7 cells transfected with CHRM1 and CHRM3 constructs. FURA-2 loaded COS-7 cells transfected with CHRM1, CHRM3 constructs or with empty vector pcDNA3.1 (Ctrl), were stimulated with 1 mM tau protein, and fluorescence time course changes were measured. (A) Control COS-7 cells transfected with pcDNA3.1 were stimulated with a pulse of 50  $\mu$ M ACh (in order to establish functional cell status) followed by 1  $\mu$ M tau. The cells do not respond to acetylcholine neither to tau. (B) COS-7 cells transfected with CHRM1 construct were stimulated to ACh, followed by tau protein. The cells respond to tau protein in a similar magnification that occurs in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. There was no response to tau when cells were pre-incubated with 100  $\mu$ M atropine. Finally, after washing the cells with perfusion buffer (see Experimental methods) a pulse of 50  $\mu$ M ACh was applied in order to confirm cell viability. (C) COS-7 cells transfected with CHRM3 were stimulated with 50  $\mu$ M ACh, 1  $\mu$ M tau protein and again with 50  $\mu$ M ACh (after rinsing with perfusion buffer). (D) As in panel C, but in this case the experiment was done with COS-7 cells transfected with both CHRM1 and CHRM3 plasmids. The trace shows the average response of  $\geq 20$  cells. Bars indicated standard deviation. In all cases the upper solid bars indicate the stimulation periods.

Finally, we like emphasize that our results on tau action, observed in non-neuronal transfected cells or in neuroblastoma cells, were confirmed in primary cultures of hippocampal and cortex neurons.

## Experimental methods

### Materials

The muscarinic receptor antagonists: atropine, Pirenzepine, Gallamine and 4-DAMP were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Monoclonal mouse anti-HA antibody (clone 12CA5) was obtained from the "Optic and Confocal Microscopy Service" (S.M.O.C., Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Madrid, Spain). Monoclonal mouse anti- $\beta$ -actin antibody was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Polyclonal rabbit anti-muscarinic acetylcholine receptor M1 was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Mammalian expression plasmids containing CMV promoter and the full-length cDNAs from human muscarinic receptors M1 (CHRM1) and M3 (CHRM3), tagged in its N-terminus with 3x HA epitope, were obtained from UMR cDNA Resource Center (Missouri, MO). pcDNA3.1 plasmid used as control and Lipofectamine 2000 transfection reagent, were obtained from Invitrogen (Carlsbad, Ca). Mammalian expression plasmid containing CMV promoter and cDNA from APP695 was a gift from Dr. Maria Recuero.

Tau peptide comprising the following sequence EIVYKSPVVSQDTSRPH, residues 391 to 407, (nomenclature of the largest tau isoform), present at the C-terminal region of the protein, was synthesized and purified, as previously described (Perez et al., 2001).

### SH-SY5Y Cell culture

Human neuroblastoma SH-SY5Y (Biedler et al., 1978) cells obtained from ATTC (Rockville, Md) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS) plus 2 mM glutamine in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. The day before performing the experiment, the cells were seeded on polylysine-coated glass coverslips at a density of 10<sup>5</sup> cells/coverslip to assay calcium dependent fluorescence analysis.

### COS-7 cell culture and transfection

African green monkey kidney fibroblast (COS-7) cells (Gluzman, 1981) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with

10% (vol/vol) FBS. The day before the transfection, the cells were seeded on polylysine-coated glass coverslips at a density of  $5 \times 10^4$  cells/coverslip. Cells were transiently transfected with CHRM1, CHRM3 containing a HA tag, or with both plasmids using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Control cells were transfected with the empty vector (pcDNA3.1, Invitrogen) at the same conditions. After 24 h of expression, transfected cells were fixed for immunofluorescence analysis or processed for calcium dependent fluorescence signal analysis.

### Primary cultures of hippocampal neurons

Hippocampal neurons were cultured as described by Banker and Cowan (1977). Newborn wild-type mice (P0), were sacrificed, and the embryos were removed under sterile conditions. Dissociated hippocampal neurons from the embryos were plated on glass coverslips coated with 1 mg/mL poly (L-lysine)

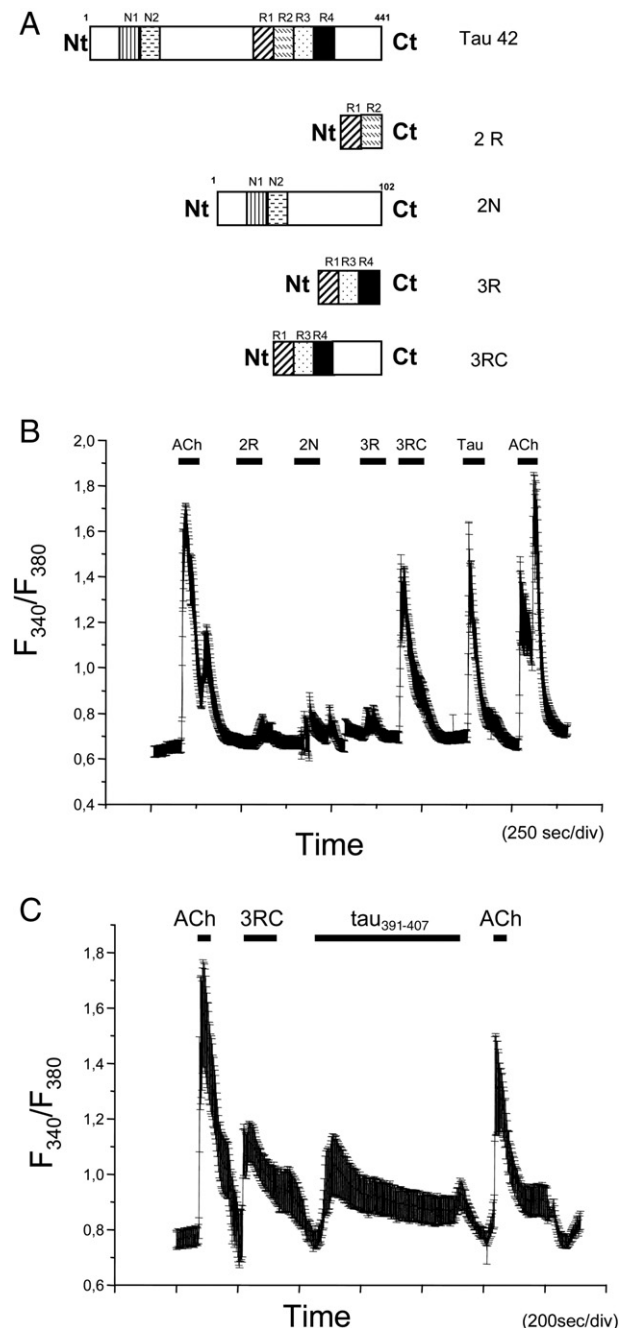


Fig. 6. Effect of tau peptides in COS-7 cells transfected with CHRM3 construct. (A) The whole tau protein and different tau peptides were assayed to determinate the putative region of tau protein involved in deregulation of calcium homeostasis: Tau 42, indicates the longest human tau isoform expressed in the SNC containing 2 inserts in its N-terminal region and 4 repeats in its microtubule binding region (Goedert and Jakes, 1990); 2R, referred to as tau peptide containing first and third repeats of Tau 42; 2N as tau peptide containing the N-terminal region of Tau 42 including its two N-terminal inserts, but no the microtubule binding regions (aminoacids 1–243); 3R referred to as tau peptide containing first, third and fourth repeats of its microtubule binding region and 3RC referred to as the C-terminal region of tau 42, including first, third and fourth microtubule binding repeats. (B) COS-7 cells transiently transfected with CHRM3 plasmid, were stimulated with a sequential sequence, thus first it was assayed at 50  $\mu$ M ACh (to check cell functionality), and after then were assayed differences in tau peptides at 1  $\mu$ M: 2N, 2R, 3R, 3RC and finally the full-length tau protein. After tau treatment, the cells were again stimulated with a pulse of 50 M ACh. The cells were washed with perfusion buffer after every application. The trace shows the average response of  $\geq 20$  cells. Bars indicated standard deviation. In all cases the upper solid bars indicate the stimulation periods. (C) FURA-2 fluorescence time course changes recorded for Cos-7 cells transiently transfected with CHRM3 plasmid, and sequentially stimulated with 50  $\mu$ M ACh, 3RC peptide and C-terminal tau peptide comprising residues 391 to 407 (tau<sub>391-407</sub>). Again, the cell viability, after tau peptide treatment was tested by a pulse of ACh.

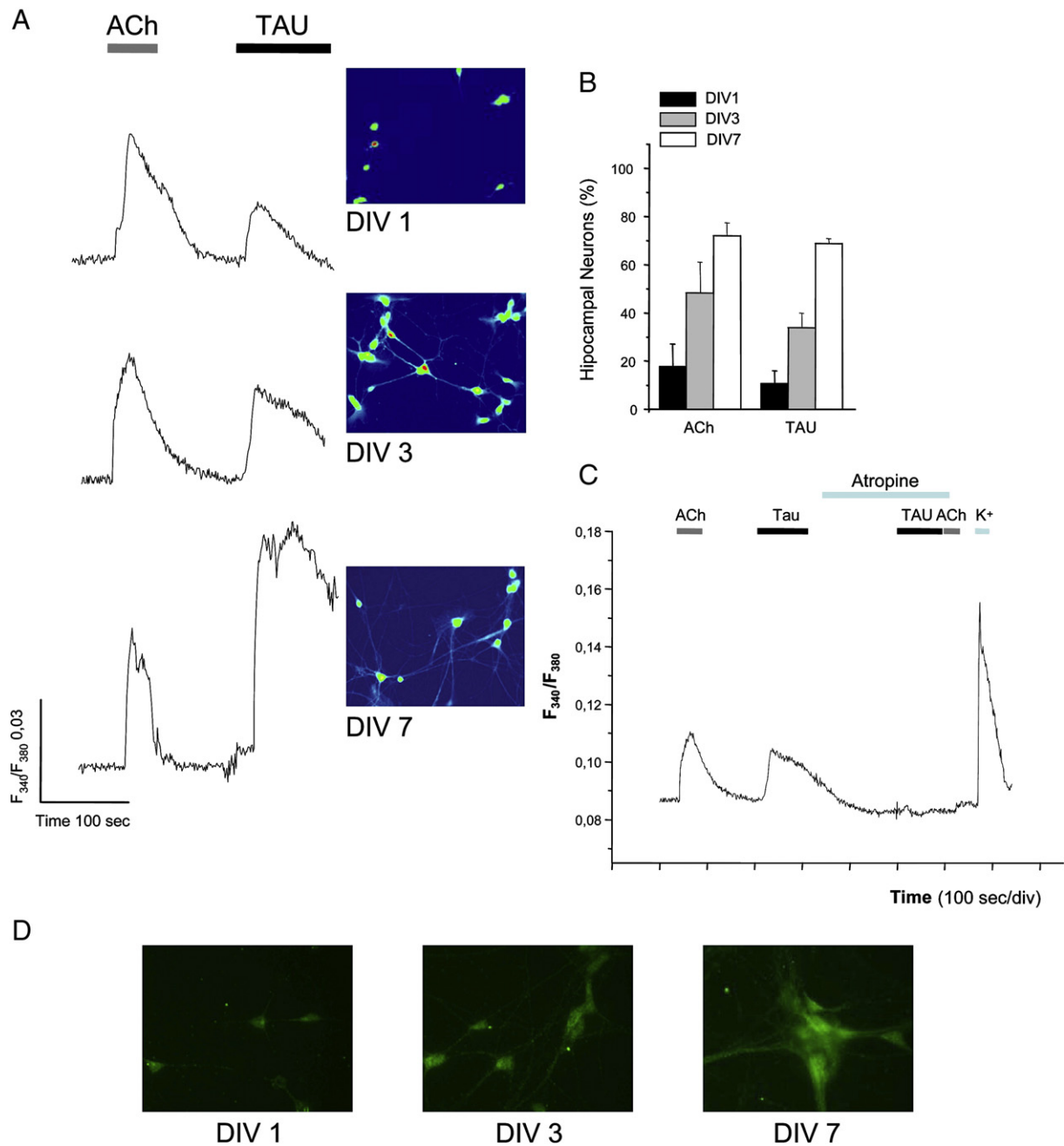


Fig. 7. Tau deregulates calcium homeostasis in primary cultured hippocampal neurons. (A) Mouse hippocampal neurons cultured for 1, 3 and 7 days, were FURA-2 loaded and the intracellular calcium levels were measured after a sequential application of 50  $\mu$ M ACh and 1  $\mu$ M tau. Insets show images showing color representations of the FURA-2 loaded hippocampal neurons responding to tau. (B) Graphic shows the percentage of mouse hippocampal neuronal cells that respond to ACh or tau at 1 (■), 3 (▒) or 7 (□) days in vitro. (C) Newborn mouse hippocampal neurons cultured for 3 days, were sequentially stimulated with 50  $\mu$ M ACh and 1  $\mu$ M tau in the presence or absence of 100 mM atropine. Finally, the neurons, were depolarized with 60  $\mu$ M KCl to confirm their viability after the treatments. (D) Mouse hippocampal neurons were fixed at 1, 3 or 7 days in vitro and processed for immunofluorescence analysis with an antibody that recognizes muscarinic acetylcholine receptor 1.

and 20  $\mu$ g/mL laminin. After incubation for 3 h in medium containing 10% (v/v) horse serum (Gibco), the cells were transferred to N2- and B27-supplemented medium (Gibco) and incubated for 1, 3 or 7 days.

#### Immunofluorescence analysis

COS-7 transiently transfected cells and primary cultures of neurons were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min. After the fixation, the coverslips were incubated with phosphate buffered saline (PBS) supple-

mented with 0.1% Triton X-100 for 10 min, then were incubated with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS/TX-100 for additional 10 min. Primary antibody anti-HA was diluted 1:2000 (vol/vol) in PBS/BSA and incubated in coverslips for 45 min at room temperature. After primary antibody incubation, coverslips were rinsed with PBS and incubated with secondary antibody (Alexa 488, Invitrogen) diluted 1:500 (vol/vol) in PBS/BSA. Finally, the coverslips were rinsed again with PBS and mounted in FluorSave (Calbiochem). Coverslips were analyzed by confocal microscopy in a Confocal MicroRadian (BioRad) coupled with a vertical microscopy Axioskop 2 (Zeiss).

### Calcium dependent fluorescence signal analysis—image acquisition and analysis of the $\text{Ca}^{2+}$ response in different cell types

Primary cultures of hippocampal and cortical neurons, human neuroblastoma SH-SY5Y and COS-7 transiently transfected cells, were washed with perfusion buffer (122 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 0.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 mM glucose and 20 mM *N*-Tris (hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid (TES) buffer, pH 7.4), and they were loaded with FURA-2 AM solution (7.5  $\mu\text{M}$ ) for 30 min at 37 °C. This period facilitated the intracellular hydrolysis of the FURA-2 AM. Subsequently, the coverslips were washed with fresh medium and mounted in a superfusion chamber in a NIKON Eclipse TE-2000 microscope. In all experiments the cells were superfused first at 1.2 mL/min with perfusion media and then, with 50  $\mu\text{M}$  ACh in order to establish the functional cell status. When tau protein was assayed, the perfusion system was stopped. When the experiments were performed with muscarinic receptor antagonists: atropine (100  $\mu\text{M}$ ), Pirenzepine (10  $\mu\text{M}$ ), 4-DAMP (2  $\mu\text{M}$ ) and Gallamine (2  $\mu\text{M}$ ), the cells were incubated for 10 min before adding ACh or tau.

At the end of each experiment, 50  $\mu\text{M}$  ACh pulses were applied to confirm the viability of the cells under study. Cells were visualized using a Nikon microscope containing a  $\times 40$  S Fluor 0.5–1.3 oil lens. The wavelength of the incoming light was filtered to 340 nm and 380 nm with the aid of a monochromator (10 nm bandwidth, Optoscan monochromator, Cairin). These wavelengths corresponded to the fluorescence peaks of  $\text{Ca}^{2+}$ -saturated and  $\text{Ca}^{2+}$ -free FURA-2 solutions. The 12-bit images were acquired with an ORCA-ER C 47 42–98 CCD camera from Hamamatsu (Hamamatsu City, Japan) controlled by Metafluor 6.3r6 PC software (Universal Imaging Corp., Cambridge, UK). The exposure time was 150 ms for each wavelength and the changing time <5 ms. The images were acquired continuously and buffered in a fast SCSI disk. The time course data represent the average light intensity in a small elliptical region inside each cell. The background and autofluorescence components were subtracted at each wavelength, and the 340 over 380 nm ratio was calibrated into  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  values using Grynkiewicz's equation (Grynkiewicz et al., 1985). The  $R_{\text{max}}$ ,  $R_{\text{min}}$  and  $\beta$  parameters were calculated from the spectra of small droplets of FURA-2 in  $\text{Ca}^{2+}$ -saturated and  $\text{Ca}^{2+}$ -free solutions (100 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM Tris, 10 mM MOPS and 100  $\mu\text{M}$  FURA-2.  $\text{Ca}^{2+}$ -free: plus 2 mM EGTA.  $\text{Ca}^{2+}$ -saturated: plus 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4) (Diaz-Hernandez et al., 2001) and the in vitro  $R_{\text{max}}$  and  $R_{\text{min}}$  were corrected for the differences with the cytosolic environment using the procedure described by Poenie (1990) and Baitinger et al. (1990).

### Protein purification

The recombinant tau isoform (tau42) containing 2 N-terminal inserts and 4 microtubule binding repeats (Goedert and Jakes, 1990), and tau fragments: 2N, containing the amino-terminal half of tau protein, (residues 1–251), tau 2R, containing residues 250–335 (deleted 274–304), tau 3R, containing residues 250–367 (deleted 274–304), and tau 3RC, containing residues 250–441 (deleted 274–304), was isolated as previously described (Perez et al., 1996). The isolated proteins were characterized by gel electrophoresis followed by staining with Coomassie blue.

### Gel electrophoresis and western blot

Cells were homogenized at 4 °C in a buffer containing 50 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, and including the phosphatase inhibitors 20 mM NaF, 0.1 mM sodium orthovanadate, and 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride. The cell lysates were centrifuged at 10,000 g for 5 min at 4 °C and then heated at 100 °C for 5 min in electrophoresis sample buffer. The protein concentration was determined by using the BCA protein assay, at 37 °C (Pierce, Rockford, IL). Proteins were fractionated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 10% gels and transferred to nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel, Germany). After blocking of non-specific protein binding to the membranes with 0.05% Tween 20 and 5% non-

fat dry milk in PBS, the membranes were incubated overnight with the primary antibodies anti-HA (1:2000, vol/vol) or anti- $\beta$ -actin (1:5000, vol/vol) in blocking buffer at 4 °C. The proteins recognized by the antibodies were visualized by using enhanced chemiluminescence (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA) after incubation with horseradish peroxidase (HRP)-linked secondary antibodies (Dako A/S, Glostrup, Denmark).

### Quantitative RT-PCR

Total RNA was purified from 35 mm dishes of confluent SH-SY5Y cells or COS-7 cells using an RNA Miniprep Kit (Stratagene) according to the manufacturer's recommended protocol. RNA extraction was followed by DNase treatment to avoid genomic DNA contamination. Then, reverse transcription was performed with both 0.08  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  oligo (dT) primers and 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  random primers using the first-strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (AMV) (Roche Applied Science) protocol.

Genomic DNA was purified from COS-7 cells using the Wizard Plus SV Genomic DNA purification system (Promega). And genomic DNA from SH-SY5Y cells was isolated using a high salt method as follows. First, nuclei lysis buffer (1% Tris EDTA pH 8.0, 0.4 M NaCl and 2 mM EDTA) was added to the cell pellet and cells were centrifuged for 10 min at 4 °C (1200 rpm). The pellet was resuspended in the lysis buffer with 0.3 mg/mL proteinase K (Merck) and 1% SDS and, then, it was incubated at 45 °C overnight. After, 6 M NaCl was added and centrifugation for 15 min (3000 rpm) was performed. The supernatant was centrifuged repeatedly until it was clear of salt. To precipitate DNA, 3 M sodium acetate pH 5.2 and cold 100% isopropanol were added to the final supernatant. DNA was transferred into a new tube containing 70% Ethanol and it was centrifuged for 30 min (14,000 rpm). Finally, the pellet was resuspended in  $\text{H}_2\text{O}$ . Each amplification was performed using genomic DNA from SH-SY5Y as template. The concentrations of PCR products were measured using Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies). Micrograms of double stranded DNA (ds DNA) were converted in picomoles:  $\text{pmol} = \mu\text{g} \times 10^6 \text{ pg} / 1 \mu\text{g} \times 1 \text{ pmol} / 660 \text{ pg} \times 1 / N$  (length of the amplicon in bp). Ten-fold serial dilutions in brewer-yeast tRNA (110 ng/ $\mu\text{L}$ , Roche Applied Science) of the PCR products starting from  $10^{-2}$  pmol were used as standards for the calibration curves.

Real-time PCR analysis was performed in the ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) in a 96-well optical plate. The PCR master mix contained 5  $\mu\text{L}$  of the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1  $\mu\text{L}$  of the template and 150 nM of each forward and reverse primers in a total volume of 10  $\mu\text{L}$ . Table 1 shows primer pairs designed among human sequences for each muscarinic receptor subtype and  $\beta$ -actin used as an endogenous control. Each primer pair reaction for each template was assayed in triplicates.

Table 1  
Primers designed for each muscarinic receptor subtype and endogenous  $\beta$ -actin (used as control)

Gene name	Orientation	Sequence	Product length (bp)
Muscarinic receptor 1	Forward	ACCTCTATACCACGTACCTG	122
	Reverse	TGAGCAGCAGATTTCATGACG	
Muscarinic receptor 2	Forward	ACCTGTGGTGTGTGACCTTT	128
	Reverse	GCTTGACTGGGTAGGTCAGA	
Muscarinic receptor 3	Forward	CATCATGAATCGATGGGCCT	128
	Reverse	GGCCTCGTGTGAAAAGTA	
Muscarinic receptor 4	Forward	CAGTTTGTGGTGGGTAAGCG	132
	Reverse	GTACAGCACCGTCATGATGA	
Muscarinic receptor 5	Forward	GATGAGTGCCAGATCCAGTT	103
	Reverse	GACAGTAGAGGATGGTCATG	
$\beta$ -actin	Forward	CACACTGTGCCCCTCTACGA	162
	Reverse	CTCCTTAATGTCACGCACGA	



Thermal cycling conditions were as follows: 10 min at 95 °C, then, 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. After the amplification, a melting curve was obtained increasing the temperature from 60 °C to 95 °C.

Different controls were carried out for each amplification: RT-PCR-template with no reverse transcriptase as a control of the genomic DNA contamination, no-template reaction as negative control and genomic DNA-template as positive control.

Mean threshold cycle ( $C_T$ ) values for each amplification performed in triplicates were normalized and analyzed using ABI prism 7000 Sequence Detection System and SDS Software (Applied Biosystems). Melting curves were studied to determine whether the primer pairs used were specific (see Table 1).

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the Spanish Plan Nacional, from the Spanish Ministry of Health, Neuropharma, Fundación M. Botín, Comunidad de Madrid and an institutional grant to CBMSO from the “Fundación R. Areces”. We thank Drs J. Lucas and F. Hernandez for the critical reading of the manuscript.

## References

- Adamczyk, A., Strosznajder, J.B., 2006. Alpha-synuclein potentiates  $Ca^{2+}$  influx through voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels. *Neuroreport* 17, 1883–1886.
- Baitinger, C., Alderton, J., Poenie, M., Schulman, H., Steinhardt, R.A., 1990. Multifunctional  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase is necessary for nuclear envelope breakdown. *J. Cell Biol.* 111, 1763–1773.
- Banker, G.A., Cowan, W.M., 1977. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res.* 126, 397–425.
- Biedler, J.L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., Freedman, L.S., 1978. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* 38, 3751–3757.
- Bowen, D.M., Smith, C.B., White, P., Davison, A.N., 1976. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* 99, 459–496.
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 82, 239–259.
- Coyle, J.T., Price, D.L., DeLong, M.R., 1983. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219, 1184–1190.
- Danzer, K.M., Haasen, D., Karow, A.R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretschmar, H., Hengerer, B., Kostka, M., 2007. Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J. Neurosci.* 27, 9220–9232.
- Davies, P., Maloney, A.J., 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2, 1403.
- Demuro, A., Mina, E., Kayed, R., Milton, S.C., Parker, I., Glabe, C.G., 2005. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* 280, 17294–17300.
- Diaz-Hernandez, M., Gomez-Villafuertes, R., Hernando, F., Pintor, J., Miras-Portugal, M.T., 2001. Presence of different ATP receptors on rat midbrain single synaptic terminals. Involvement of the P2X(3) subunits. *Neurosci. Lett.* 301, 159–162.
- Fritz, N., Macrez, N., Mironneau, J., Jeyakumar, L.H., Fleischer, S., Morel, J.L., 2005. Ryanodine receptor subtype 2 encodes  $Ca^{2+}$  oscillations activated by acetylcholine via the M2 muscarinic receptor/cADP-ribose signalling pathway in duodenum myocytes. *J. Cell Sci.* 118, 2261–2270.
- Geula, C., Mesulam, M.M., 1996. Systematic regional variations in the loss of cortical cholinergic fibers in Alzheimer's disease. *Cereb. Cortex* 6, 165–177.
- Geula, C., Mesulam, M.M., 1999. Cholinergic systems in Alzheimer's disease. *Alzheimer Disease*, 2nd Ed. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 69–292.
- Gluzman, Y., 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175–182.
- Gnagey, A.L., Seidenberg, M., Ellis, J., 1999. Site-directed mutagenesis reveals two epitopes involved in the subtype selectivity of the allosteric interactions of gallamine at muscarinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* 56, 1245–1253.
- Goedert, M., Jakes, R., 1990. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *Embo J.* 9, 4225–4230.
- Gomez-Ramos, A., Diaz-Hernandez, M., Cuadros, R., Hernandez, F., Avila, J., 2006. Extracellular tau is toxic to neuronal cells. *FEBS Lett.* 580 4842–4850.
- Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440–3450.
- Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356.
- Kumar, P., Wu, H., McBride, J.L., Jung, K.E., Kim, M.H., Davidson, B.L., Lee, S.K., Shankar, P., Manjunath, N., 2007. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448, 39–43.
- Lambert, D.G., Nahorski, S.R., 1990. Muscarinic-receptor-mediated changes in intracellular  $Ca^{2+}$  and inositol 1,4,5-trisphosphate mass in a human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y. *Biochem. J.* 265, 555–562.
- Lanzafame, A.A., Christopoulos, A., Mitchelson, F., 2003. Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. *Receptors Channels* 9, 241–260.
- Mash, D.C., Flynn, D.D., Potter, L.T., 1985. Loss of M2 muscarine receptors in the cerebral cortex in Alzheimer's disease and experimental cholinergic denervation. *Science* 228, 1115–1117.
- Mesulam, M., 2004. The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show. *Learn. Mem.* 11, 43–49.
- Murphy, N.P., Vaughan, P.F., Ball, S.G., McCormack, J.G., 1991. The cholinergic regulation of intracellular calcium in the human neuroblastoma, SH-SY5Y. *J. Neurochem.* 57, 2116–2123.
- Nitsch, R.M., Slack, B.E., Wurtman, R.J., Growdon, J.H., 1992. Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 258, 304–307.
- Perez, M., Valpuesta, J.M., Medina, M., Montejó de Garcini, E., Avila, J., 1996. Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau–tau interaction. *J. Neurochem.* 67, 1183–1190.
- Perez, M., Arrasate, M., Montejó de Garcini, E., Munoz, V., Avila, J., 2001. In vitro assembly of tau protein: mapping the regions involved in filament formation. *Biochemistry* 40, 5983–5991.
- Perry, E.K., Blessed, G., Tomlinson, B.E., Perry, R.H., Crow, T.J., Cross, A.J., Dockray, G.J., Dimaline, R., Arregui, A., 1981. Neurochemical activities in human temporal lobe related to aging and Alzheimer-type changes. *Neurobiol. Aging* 2, 251–256.
- Poenie, M., 1990. Alteration of intracellular Fura-2 fluorescence by viscosity: a simple correction. *Cell Calcium* 11, 85–91.
- Rosati, A.M., Guarnieri, E., Avignone, E., Cherubini, E., Cattaneo, A., Traversa, U., 1999. Increased density of M1 receptors in the hippocampus of juvenile rats chronically deprived of NGF. *Brain Res.* 815, 185–191.
- Wess, J., Eglén, R.M., Gautam, D., 2007. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 6, 721–733.
- Zuchner, T., Perez-Polo, J.R., Schliebs, R., 2004. Beta-secretase BACE1 is differentially controlled through muscarinic acetylcholine receptor signaling. *J. Neurosci. Res.* 77, 250–257.
- Zuchner, T., Schliebs, R., Perez-Polo, J.R., 2005. Down-regulation of muscarinic acetylcholine receptor M2 adversely affects the expression of Alzheimer's disease-relevant genes and proteins. *J. Neurochem.* 95, 20–32.



# Effect of Cortistatin on Tau Phosphorylation at Ser262 Site

Alicia Rubio,<sup>1</sup> Mar Pérez,<sup>1,2</sup> Luis de Lecea,<sup>3</sup> and Jesús Ávila<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa,” Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universidad Autónoma de Madrid (CSIC/UAM), Madrid, Spain

<sup>2</sup>Department of Anatomy, Histology and Neuroscience, Faculty of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain

<sup>3</sup>Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Stanford University, Stanford, California

The development of intraneuronal lesions as a result of the progressive deposition of hyperphosphorylated tau at specific brain regions (such as hippocampus and cortex) plays a key role in the pathological process of Alzheimer's disease. However, the mechanisms by which tau phosphorylation is regulated, mainly in the pathology found in the cortex, are still poorly understood. Here, we analyzed the effect of cortistatin, a cortical neuropeptide related to somatostatin, on tau phosphorylation at Ser262 in cultures of murine cortical neurons. Both somatostatin and cortistatin induce tau phosphorylation at Ser262, a site modified in Alzheimer's disease, although with different kinetics in cortex. The effect of cortistatin likely is mediated by heterodimeric receptors composed of somatostatin receptor subtypes 2 and 4 and also by protein kinase C signaling. Cortistatin-deficient mice show decreased tau phosphorylation at Ser262 in the cortex but not in other brain regions tested. Our results suggest an important role for cortistatin in the regulation of tau phosphorylation that may be associated with the pathophysiology of Alzheimer's disease in regions such as the cerebral cortex. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** Alzheimer's disease; somatostatin; internalization; somatostatin receptors; real-time PCR

Alzheimer's disease is a senile dementia characterized by the presence of two aberrant structures: senile plaques and neurofibrillary tangles (Alzheimer, 1906). The number of cortical neurofibrillary tangles, which mainly contain an abnormal hyperphosphorylated form of the microtubule-associated tau protein, correlates positively with the severity of dementia (Arriagada et al., 1992).

Development of the disease is related to that of tau pathology. First, the entorhinal cortex and hippocampus are affected, and then cortical neurons degenerate progressively (Braak and Braak, 1991). In addition, the progression of tau phosphorylation was shown to correlate with the evolution of tau pathology (Delacourte et al., 1999), being a critical step for the development of the disease when phosphorylation associated with tau pathology appears at the cortex (Delacourte et al., 1999).

Thus, the study of tau phosphorylation in this cerebral region seems to be relevant. The modification of tau by phosphorylation affects its interaction with microtubules (for review see Avila et al., 2004). Tau phosphorylation depends on the balance of protein kinase and phosphatase activities (Goedert et al., 1992; Iqbal and Grundke-Iqbal, 1997). Signals that regulate these kinase/phosphatase activities in different brain regions can have profound consequences on microtubule stability and in the onset of Alzheimer's disease (Goedert et al., 1992; Iqbal and Grundke-Iqbal, 1997). Among those signals could be the peptides that belong to the somatostatin family.

Cortistatin is a neuropeptide of the somatostatin family expressed in  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-ergic neurons in the cerebral cortex and hippocampus (de Lecea et al., 1996, 1997), brain regions first affected by Alzheimer's disease. Prepro-cortistatin mRNA expression is significantly increased in the hippocampus during normal aging but is attenuated in aged transgenic mice overexpressing the human  $\beta$ -amyloid precursor protein (Winsky-Sommerer et al., 2004). Several studies provide evidence for a modulatory role of cortistatin in memory processes. Intraventricular injection of cortistatin was shown to impair memory consolidation in rats (Flood et al., 1997; Sanchez-Alavez et al., 2000). Cortistatin has an inhibitory effect on the excitability of CA1 neurons

Supplementary Material for this article is available online at <http://www.mrw.interscience.wiley.com/suppmat/0360-4012/suppmat/> ([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)).

Contract grant sponsor: Spanish Ministry of Education and Science and Ministry of Health and CIBERNED, Spain; Contract grant sponsor: Ministry of Education and Science, Spain (to A.R.); Contract grant number: MH58543 (to L.d.L.).

\*Correspondence to: Jesús Ávila, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa,” Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universidad Autónoma de Madrid (CSIC/UAM), Nicolás Cabrera 1, Universidad Autónoma de Madrid Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. E-mail: [javila@cbm.uam.es](mailto:javila@cbm.uam.es)

Received 13 November 2007; Revised 4 January 2008; Accepted 21 January 2008

Published online 25 April 2008 in Wiley InterScience ([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)). DOI: 10.1002/jnr.21689

(de Lecea et al., 1996; Schweitzer et al., 2003) and blocks long-term potentiation (LTP) in perforant path-dentate gyrus synapses. Transgenic mice overexpressing cortistatin also show deficits in LTP and in spatial memory (Tallent et al., 2005).

Cortistatin could constitute an endogenous signal that modulates protein kinase/phosphatase activity affecting tau phosphorylation in the brain regions critical for the development of Alzheimer's disease. The present work is focused on the effect of cortistatin on tau phosphorylation at Ser262 site in cultures of murine cortical neurons. Our data point to a relevant role for cortistatin in tau phosphorylation at Ser262 in the cortex with potential implications in the progression of tau pathology in Alzheimer's disease.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Experimental animals were wild-type C57BL6, cortistatin knockout, and somatostatin receptor (*sst*-2 and -4 knockout mice, and *sst*2/4 double-knockout mice (Videau et al., 2003). These strains were congenic in the C57BL6 background (N9). Primary cortical neurons were obtained from P0–P1 littermates of wild-type and *sst*2 and -4 knockout mice and from *sst*2/4 double-knockout mice. Wild-type and cortistatin knockout mice (3-month-old male) were used for protein extracts ( $n = 3$  for each genotype). Mice were maintained in a temperature-controlled environment on a 12/12-hr light-dark cycle, with food and water available ad libitum. All procedures were approved by the animal research committee at the Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (UAM-CSIC, Madrid, Spain).

### Antibodies and Reagents

The monoclonal antibodies against tau protein used for this study were: 7.51 (a gift from Dr. C. Wischik, MRC, Cambridge, United Kingdom), 12E8 (a gift from Dr. P. Seubert, Elan Pharmaceuticals, South San Francisco, CA), and PHF1 (a gift from Dr. P. Davies, New York, NY). The 7.51 antibody recognizes an epitope located in the last two repeats of the tau protein microtubule-binding domain and reacts with all tau isoforms in a phosphorylation-independent manner (Novak et al., 1991). The 12E8 antibody detects tau phosphorylated at Ser262 (Seubert et al., 1995), and the PHF1 antibody recognizes tau protein when Ser396 and Ser404 are phosphorylated (Greenberg et al., 1992; Otvos et al., 1994). The numbering of the tau epitopes is given according to the longest human tau isoform of 441 amino acids (Goedert et al., 1989). The 334 polyclonal antibody specifically detects the carboxyl-terminal region of the neural  $\beta_3$  isoform of tubulin (Diaz-Nido et al., 1990).

Cortistatin coupled to fluorescein at Lys3 (Fluo-cortistatin) was custom synthesized at SynPep (Dublin, CA). Fluorescein was attached to the Lys3 residue because the exocyclic N-terminal proline residue is essential for its binding and specific activities (Criado et al., 1999). The structure and integrity of the peptide were verified by mass spectroscopy at TSRI's protein chemistry facility. Cortistatin 1–14 and somato-

statin 1–14 were obtained from Neomps (Strasbourg, France) and from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), respectively (see amino acid sequences of both compounds in Suppl. Fig. 1). Octreotide, a somatostatin analogue that binds preferentially to *sst*2, -3, and -5 receptors, and Ro 31-8220, a protein kinase C (PKC) inhibitor, were purchased from Sigma-Aldrich and from Roche (Basel, Switzerland), respectively.

### Cell Culture, Transfection, and Treatment

Human embryonic kidney cells (HEK-293) were grown in 12-well plates in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum, 2 mM glutamine, 1 mM pyruvate, 100 U/ml penicillin, and 100 U/ml streptomycin in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air at 37°C. Cells were transiently transfected with different combinations of plasmids containing cDNA of tau, *sst*2, or *sst*4 in pCDNA3.1 vector using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) as described by the manufacturer. Control cells were transfected with the empty vector (pCDNA3.1; Invitrogen) in the same conditions. One day after the transfection, the medium was replaced by serum-free DMEM for 2 hours, after which cortistatin was added at different concentrations (5–500 nM) for 30 min. Similarly, after 2 hr in serum-free DMEM, cells were treated with somatostatin (5–500 nM) for 5 min. Finally, protein extracts from cells were analyzed by Western blot.

### Primary Cortical Culture Procedure and Treatment

Cortical neurons were obtained from P0–P1 mouse littermates. Papain (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ) was used to dissociate the cells (Banker and Cowan, 1977). The cells were plated on poly-L-lysine (100  $\mu$ g/ml)- plus laminin (10  $\mu$ g/ml)-coated plastic dishes ( $1.8 \times 10^5$  cells/24-well plate) and cultured in Neurobasal medium (Gibco, Carlsbad, CA) supplemented with 10% (vol/vol) horse serum, 2 mM glutamine, 1 mM pyruvate, 100 U/ml penicillin, and 100 U/ml streptomycin. After 3 hours, the medium was changed to Neurobasal medium supplemented with 1% (vol/vol) B27 (Gibco), 2 mM glutamine, 1 mM pyruvate, 100 U/ml penicillin and 100 U/ml streptomycin. The cells were grown in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air at 37°C, and half of the medium was replaced every 2–3 days.

The experiments were performed after 8 days in vitro, when functional somatostatin receptors are known to be expressed in cultured primary neurons (Heidet et al., 1990; Stroh et al., 2000). After 2 hr in serum-free Neurobasal medium, the peptides or other compounds were added to the cultures. The primary cultures were incubated with or without 50 nM somatostatin for different times. In separate experiments, cortistatin or octreotide were also added at different concentrations and incubation times. In some cases, the cells were incubated in the presence of 10  $\mu$ M Ro 31-8220, a PKC inhibitor, for 90 min, or pretreated with 10  $\mu$ M Ro 31-8220 for 60 min, followed by the addition of 50 nM cortistatin for an additional 30 min. Thereafter, protein isolation and Western blot analysis were performed.



### Protein Isolation and Western Blot Analysis

Three-month-old mice wild-type and cortistatin knock-out mice were sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation. Then, brain was quickly dissected into cortex, hippocampus, and the remaining tissue on an ice-cold plate. These different samples were homogenized separately in an ice-cold buffer containing 20 mM Hepes pH 7.4, 100 mM NaCl, 20 mM NaF, 5 mM EDTA, and 1% (wt/vol) Triton X-100 and supplemented with 30 mM glycerophosphate, 5 M pyrophosphate, 1  $\mu$ M okadaic acid, and a cocktail of protease inhibitors (2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, and 10  $\mu$ g/ml pepstatin; Roche, Basel, Switzerland). Lysates were centrifuged at 12,000g for 15 min at 4°C, and pellets were discarded. The amount of protein in the supernatants was quantified by using the Bradford assay (Bradford, 1976).

Primary cortical neurons and transiently transfected HEK-293 cells were lysed in electrophoresis sample buffer [50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 2% (wt/vol) sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1% (wt/vol) bromophenol blue, 10% (vol/vol) glycerol] supplemented with 30 mM glycerophosphate, 5 M pyrophosphate, 1  $\mu$ M okadaic acid, and a cocktail of protease inhibitors (Roche). One well of each culture was homogenized according to the protein isolation protocol for brain tissue (indicated above) to determine the protein content via Bradford assay (Bradford, 1976). Both protein extracts obtained from brain tissue and primary cultures were boiled for 10 min in the electrophoresis sample buffer.

Fifteen micrograms of total protein were run on 10% SDS-PAGE gels and electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH). After blocking of nonspecific protein binding to the membrane with 0.05% (vol/vol) Tween 20 and 5% (wt/vol) nonfat dry milk in phosphate-buffered saline (PBS), the filter was incubated for 1 hr at room temperature with the monoclonal primary antibody. Primary antibodies used for this assay were diluted in the blocking solution as follows: 12E8 (1/1,000), PHF1 (1/100), and 7.51 (1/100). After three washes with 0.05% (vol/vol) Tween 20 in PBS, the membrane was incubated with a horseradish peroxidase (HRP)-linked secondary goat anti-mouse antibody (1/2,000; Dako, Glostrup, Denmark), followed by several washes. To visualize the immunodetection, Western Lightning reagents were used (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA).

Finally, the labelled protein was subjected to densitometric analysis for quantification. The optical density of the stained protein bands, in arbitrary units, was measured in the Quantity One program (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). To determine tau phosphorylation levels at Ser262 site and Ser396/404 site using 12E8 and PHF1 antibodies, respectively, data were normalized to total tau levels determined by the 7.51 antibody.

### Immunofluorescence Microscopy

Medium of primary cortical neurons cultures grown on coated coverslips ( $1 \times 10^5$  cells/24-well plate) for 8 days was changed to serum-free Neurobasal medium for 2 hours, after

which several compounds were added to the cultures. In this way, the cultures were incubated with 1–5  $\mu$ M Fluo-cortistatin for 1 or 30 min. Some of the cultures were preincubated either with 100  $\mu$ M cortistatin or with 100  $\mu$ M somatostatin for 10 min, and then 1  $\mu$ M Fluo-cortistatin was added for 30 min. In another experiment, the primary cultures were pretreated with 1  $\mu$ M phenylarsine oxide (PAO; Sigma-Aldrich), an endocytosis inhibitor, diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich) for 30 min, and then 5  $\mu$ M Fluo-cortistatin was added for additional 30 min. A control experiment was also performed by adding the same volume of DMSO instead of PAO for 30 min, followed by the addition of 5  $\mu$ M Fluo-cortistatin for 30 min.

We fixed the primary cultures with 4% (wt/vol) paraformaldehyde in PBS plus 5 mM MgCl<sub>2</sub> for 10 min at 37°C. After three washes with PBS for 5 min each, the cells were subsequently incubated with different solutions, in the dark, at room temperature. Fixed cells were permeabilized with 0.1% (vol/vol) Triton X-100 in PBS for 15 min. Then, 1 M glycine in PBS was added for 30 min to the coverslips, followed by the blocking solution [1% (wt/vol) BSA in PBS] for 45 min. To detect microtubules in neurons, we incubated the cultures with a 1/1,000 dilution of tubulin-specific primary antibody (334) in 1% (wt/vol) BSA in PBS for 60 min. After two washes, the secondary antibody Alexa 555 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) diluted 1/1,000 in the blocking solution was added for 45 min, then rinsed three times with PBS. One minute of incubation with DAPI (Calbiochem, San Diego, CA; 1/10<sup>5</sup>) was used for nuclear staining. Finally, the coverslips were washed in PBS three times and mounted in glycerol:PBS (1:1). The cells were imaged in two sessions with a Zeiss Axiovert 200M inverted microscope (Carl Zeiss International, Thornwood, NY) and a Leica Confocal SP2 AOBS (Leica, Wetzlar, Germany) using excitation at 405 nm, 488 nm, and 543 nm. DAPI, fluorescein, and Alexa 555 were detected using bandpass filters at 435–485 nm, at 500–550 nm, and at 565–615 nm, respectively. Images were acquired sequentially using the associated software and processed in Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, CA). Cells shown are representative of the majority of cells observed at a magnification of  $\times 63$  (Carl Zeiss International).

Cells were counted at  $\times 40$  magnification in randomly selected fields (approximate area of 0.2 mm<sup>2</sup>) with a Zeiss fluorescent microscope. Cells with internalized Fluo-cortistatin were considered only if intense green labeling was exhibited. Proportion of labeled cells (vs. total number of cells) was obtained from counting 100–250 total cells per field in the coverslips incubated in the presence of 5  $\mu$ M Fluo-cortistatin for 30 min ( $n = 5$  coverslips). Total number of cells represents the number of nuclei stained with DAPI. To compare the experiments with 1  $\mu$ M Fluo-cortistatin for 30 min and with 100  $\mu$ M cortistatin or somatostatin for 10 min and then 1  $\mu$ M Fluo-cortistatin for 30 min, green-labeled cells were counted in 20 fields ( $n = 4$  coverslips per condition).

### RT-PCR Analysis

Numerous binding data support the idea that somatostatin receptors are expressed not only in neurons but also in

**TABLE I. Primers Used for the Amplification of Somatostatin Receptor Subtypes (Sst1–5), Beta-Actin and Tau (5'–3')**

Gene name	Orientation	Position	Sequence
Sst1	Fw	734	TATTGCTGATGAGCTGCTCATGCTC
	Re	862	TCCACACTAAGCACAGTCAGACAGT
Sst2	Fw	850	ATCAGCCCCACCCCAGCCCTGAA
	Re	984	GCAAAGAACATTCTGGAAGCTCTTC
Sst3	Fw	2,176	CAAGGAGATATACCAGGACTTGGGA
	Re	2,292	TAGGACACTGGACTGTCCTGCAGAA
Sst4	Fw	863	AACAACGGAGGCGCTCAGAGAAGAA
	Re	962	TCGAGGCTGGTACAAACAGGTTCA
Sst5	Fw	856	GGGCTGGGGCACCTGCAACCTGA
	Re	1,195	GACAGGACCACCAAAAGAAGTAGA
Mouse beta-actin	Fw	1,379	GGCGTTTTGACTCAGGATT
	Re	1,448	GGGATGTTTGCTCCAACCAA
Human beta- actin	Fw	553	CACACTGTGCCCATCTACGA
	Re	715	CTCCTTAATGTCACGCACGA
Tau	Fw	573	GCGGATCCATATGGGGGATCGCAGC
	Re	768	CCGAATTCTAGGGCACGGGGG

cultured glial cells obtained from rodent brains (van Calker et al., 1980; Mentlein et al., 1990; Heidet et al., 1990; Hosli and Hosli, 1994; Feindt et al., 1995). Nevertheless, it is noteworthy that the expression of somatostatin receptors in cultured neurons is more abundant than in cultured glial cells obtained from mice (Heidet et al., 1990). To focus on neuronal somatostatin receptors, we prevented glial proliferation by adding 5  $\mu$ M arabinofuranosylcytosine (Ara-C; Calbiochem, San Diego, CA) 2 days after plating the primary cortical neurons ( $1 \times 10^6$  cells/P35-coated dish). After culture for 8 days, neurons were incubated for 2 hr in serum-free Neurobasal medium, after which total RNA was extracted, followed by DNase treatment with an RNA Miniprep Kit (Stratagene, La Jolla, CA), as described by the manufacturer. Similarly, RNA from transiently transfected HEK-293 cells was purified. RNA concentration and quality were checked using the Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE).

RNA (480 ng) was reverse transcribed into single-stranded cDNA for PCR with both 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l random hexanucleotide primers and 0.08  $\mu$ g/ $\mu$ l oligo-(dT) primers using the first-strand cDNA synthesis kit (AMV; Roche).

The amount of RNA for each murine somatostatin receptor subtype expressed by cortical neurons in culture was analyzed by using the Sybr Green PCR method ( $n = 3$ ). The expression of tau protein and murine sst2 and sst4 by transiently transfected HEK-293 cells was also studied. Each 10- $\mu$ l reaction contained 1  $\mu$ l of the template [either cDNA or cDNA diluted (1:5) or plasmid DNA], 5  $\mu$ l of the Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), and 150 nM each of sense and antisense primers. Primer pair sequences used for each gene-specific primer pair are shown in Table 1 (Cristiani et al., 2000). Murine beta-actin was used as an endogenous control to normalize differences in total RNA amounts from primary cortical cultures. Also, the amount of RNA from transiently transfected HEK-293 cells was normalized using human beta-actin data.

Thermocycling parameters were as follows: 10 min at 95°C, then 50 cycles of 15 sec at 95°C and 1 min at 60°C.

After the amplification, a melting curve was obtained, increasing the temperature from 60°C to 95°C. Fluorescent signal was acquired during the annealing step by the ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). To determine whether the amplification was specific, each dissociation curve was analyzed. In addition, mouse pituitary cDNA and different plasmids were used as positive controls for sst5 and sst1–4 respectively. No-template reactions, for each primer pair, were used as negative controls. For each amplicon, reactions were carried out in triplicate, from which mean threshold cycle ( $C_T$ ) values plus SD were calculated and normalized for both diluted and nondiluted templates. Primer and reaction specificity were assessed by dissociation curve analysis for each primer set.

### Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using ANOVA, followed by a Bonferroni post hoc test in those results shown in Figure 2B and Student's *t*-test in Figures 1, 2A, 3, and 5–7. Chi square was used to analyze the number of cells with internalized Fluo-cortistatin in the experiments with 1  $\mu$ M Fluo-cortistatin for 30 min and with 100  $\mu$ M cortistatin or somatostatin for 10 min and then 1  $\mu$ M Fluo-cortistatin for 30 min. Fields of an approximate area of 0.2 mm<sup>2</sup> with three or more cells with green labeling were considered as positive.

## RESULTS

### Tau Phosphorylation at Ser262 Is Decreased in the Cortex of Cortistatin-Deficient Mice

The appearance of tau pathology (phosphorylation and aggregation) in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease seems to represent a critical point in the development of the disease (Delacourte et al., 1999). This specific tau phosphorylation in the cerebral cortex could be due to the presence of a cortical neuropeptide, cortistatin. To test this possibility first, we compared tau phosphorylation between mice lacking cortistatin

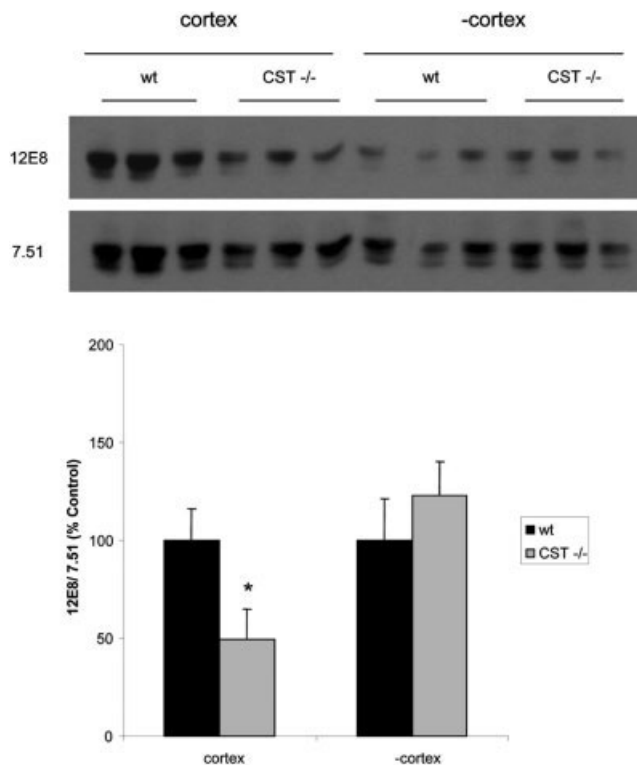


Fig. 1. Tau phosphorylation at Ser262 is decreased in the cortex of cortistatin-deficient mice (CST<sup>-/-</sup>). Protein extracts from the cortex and the brain tissue without cortex and hippocampus (-cortex) were obtained from 3-month-old wild-type (wt) mice and CST<sup>-/-</sup> mice. Western blots and quantification (lower panel) by densitometry of tau phosphorylation at Ser262 (using 12E8 antibody) normalized with the levels of total tau protein (7.51 antibody). Tau phosphorylation at Ser262 was shown to be decreased twofold in extracts obtained from the cortex of CST<sup>-/-</sup> mice compared with age-matched wt mice (49% ± 16% in CST<sup>-/-</sup> vs. 100% ± 16% in wt;  $P < 0.05$ ). No differences were found in -cx between wt and CST<sup>-/-</sup> mice. Data are shown as means ± SEM ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$  vs. controls.

(CST<sup>-/-</sup>) and wild-type (wt) mice in the cortex and in other brain regions.

Our experiments show that tau phosphorylation at Ser262 was decreased twofold in extracts obtained from the cortex of CST<sup>-/-</sup> mice compared with age-matched wt mice (49% ± 16% in CST<sup>-/-</sup> vs. 100% ± 16% in wt;  $P < 0.05$ ; Fig. 1).

Similarly, the levels of tau phosphorylation at Ser262 were analyzed in protein extracts obtained from brain tissue (depleted of cortex and hippocampus) of the same animals. In contrast to the results obtained from the extracts of cortex, no differences were found between wt and CST<sup>-/-</sup> mice (123% ± 17% in CST<sup>-/-</sup> compared with 100% ± 21% in wt; Fig. 1). No differences were found either when hippocampus from wt and CST<sup>-/-</sup> animals were compared (data not shown). Thus, cortistatin appears to modulate tau phosphorylation specifically in the cortex, suggesting that these neu-

rons are targets of cortistatin. Therefore, we next studied the effect of cortistatin in cortical neurons in culture.

### Cortistatin Promotes Tau Phosphorylation at Ser262

To measure the effect of different cortistatin concentrations on tau phosphorylation, primary cortical neurons were incubated in the presence of 5 nM, 50 nM, and 500 nM cortistatin for 30 min (Fig. 2A). Different concentrations of cortistatin increase tau phosphorylation at Ser262, reaching a plateau at 50 nM cortistatin (183% ± 35% compared with 100% ± 20% in controls;  $P < 0.05$ ).

We next incubated cortical neurons with 50 nM cortistatin during 5 min, 15 min, and 30 min and measured tau phosphorylation at Ser262 by Western blot. The level of phosphorylated tau at Ser262 was increased twofold in the presence of cortistatin during 30 min (201% ± 24% vs. 100% ± 19% in control samples;  $P < 0.01$ ; Fig. 2B).

We also tested whether cortistatin induced tau phosphorylation at Ser396/404 recognized by PHF1 antibody. However, no differences were found in this epitope (data not shown).

Because cortistatin belongs to the somatostatin family and to elucidate the effect of somatostatin on tau phosphorylation at Ser262 site, we treated primary cultures of cortical neurons from mice with 50 nM somatostatin for 5, 15, and 30 min. Figure 3 shows that 5 min of incubation with somatostatin significantly increases tau phosphorylation at Ser262 (165% ± 21% vs. 100% ± 19% in control samples;  $P < 0.05$ ). Thus, somatostatin also induces an increase in tau phosphorylation, albeit at a faster rate than cortistatin.

We then tested whether somatostatin also promotes tau phosphorylation at Ser396/404 recognized by PHF1 antibody. As for cortistatin, incubation with somatostatin at different times did not appear to change the phosphorylation found at Ser396/404 tau phospho-site (data not shown).

### Murine Cortical Neurons in Culture Have Receptors for Cortistatin

To determine whether the effect of cortistatin on tau phosphorylation at Ser262 was mediated through its binding to specific receptors, we tested binding and internalization of cortistatin coupled to fluorescein (Fluo-cortistatin) in murine primary cultures of cortical neurons. Incubation with Fluo-cortistatin (1–5 μM) for 30 min resulted in punctate fluorescence labeling distributed throughout the soma, indicative of internalization of cortistatin-bound receptors (Fig. 4A). The number of cells showing internalization was assessed by labeling the cultures with antiserum against tubulin and DAPI, for visualization of nuclei, and 24% ± 8% of the cells treated with Fluo-cortistatin (5 μM) showed internalization (Fig. 4A). In contrast, a short incubation of Fluo-cortistatin during 1 min did not show any labeling (Fig. 4B). Binding and internalization of Fluo-cortistatin were

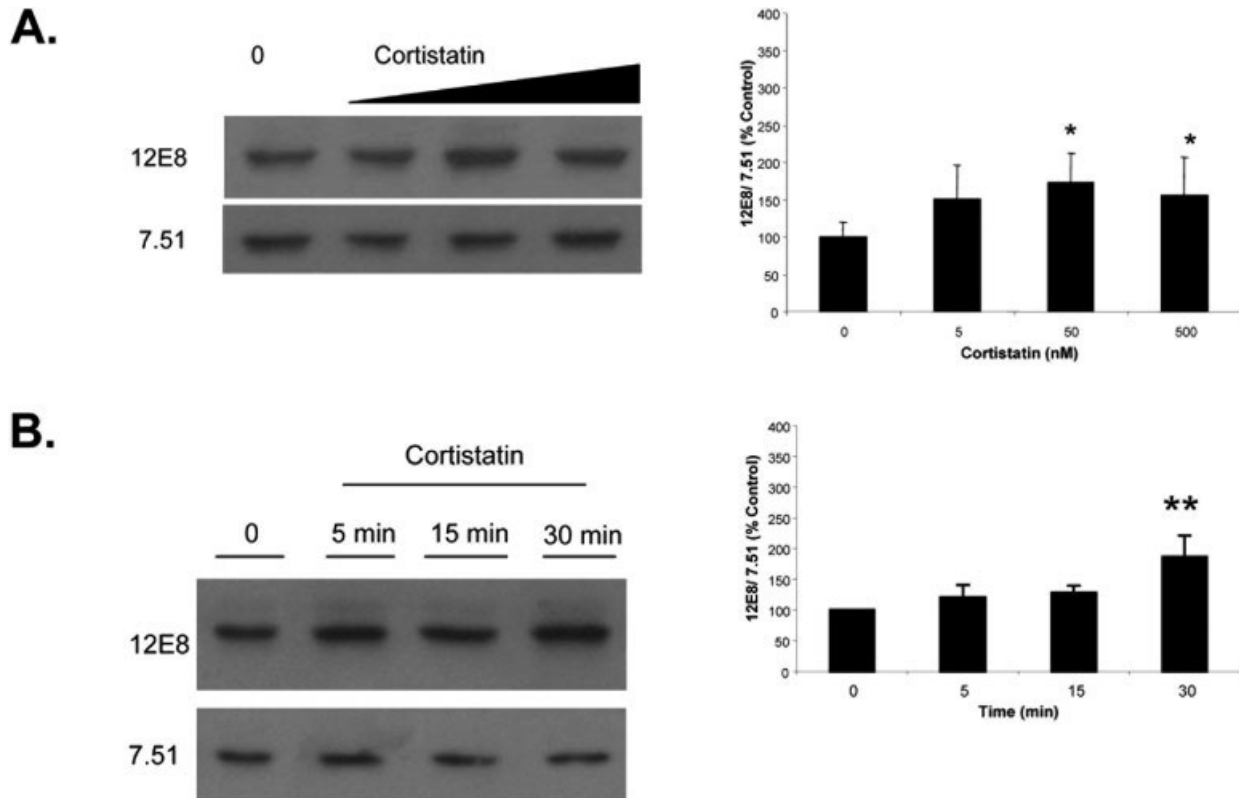


Fig. 2. Effect of cortistatin on tau phosphorylation at Ser262 in primary cortical neurons. **A:** To test the effect of cortistatin concentration, cells were incubated in the presence of 5 nM, 50 nM, and 500 nM cortistatin for 30 min. Then, protein extracts were analyzed by Western blot. Quantification (right panel) of tau phosphorylation at the Ser262 site recognized by 12E8 antibody was performed by densitometric analysis, and the result is indicated in arbitrary units. Tau phosphorylation data were normalized with total tau level detected by 7.51 antibody. Cortistatin increases significantly tau phosphorylation at Ser262 site at different concentrations ( $183\% \pm 35\%$  for

50 nM cortistatin compared with  $100\% \pm 20\%$  in controls). **B:** In a separate experiment, primary cortical neurons in culture were incubated with 50 nM cortistatin for 5, 15, and 30 min. Then, Western blots and quantification (right panel) were performed as described above to determine tau phosphorylation at Ser262 (12E8 antibody) normalized with total tau levels (7.51 antibody). The level of tau phosphorylation at Ser262 site was increased twofold in the presence of 50 nM cortistatin for 30 min ( $201\% \pm 24\%$  vs.  $100\% \pm 19\%$  in control samples;  $P < 0.01$ ). In A and B, data are means  $\pm$  SEM of experiments carried out in triplicate. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. control.

significantly competed in the presence of a molar excess of unlabeled 100  $\mu$ M cortistatin or somatostatin ( $P < 0.05$ ), suggesting that binding was mediated through somatostatin receptors. Fluo-cortistatin labeling was also inhibited by preincubation with 1  $\mu$ M phenylarsine oxide (PAO), an endocytosis inhibitor, but not with the same volume of vehicle (not shown), suggesting that Fluo-cortistatin internalization was mediated via clathrin-coated pits in cortical neurons (Fig. 4C).

### Primary Cortical Cultures Express All Five Somatostatin Receptor Subtypes

Because somatostatin displaces Fluo-cortistatin binding in cultured neurons, it is likely that cortistatin binds to somatostatin receptors in these neurons. To determine which somatostatin receptor was responsible for binding cortistatin in cortical cultures, we performed quantitative real-time PCR measurements of somatosta-

tin receptor mRNA concentrations. The Sybr Green PCR method was used, and the normalized amplification curves ( $C_T$ ) of each somatostatin receptor subtype was determined to measure the levels of expression.

Murine cortical neurons express transcripts for the five somatostatin receptor subtypes according to RT-PCR results (Fig. 5A). Sst2 mRNA is the most abundant (almost 10 times more than sst1 and sst4 mRNAs), followed by sst1 and sst4 mRNAs. The amount of sst3 expressed in cortical neurons is less relevant (about 1% of that of sst2), whereas sst5 mRNA could be detected only after 30 cycles of amplification (less than 0.1% of that of sst3) and is the least abundant.

Insofar as cortistatin binding to the cell receptors results in its internalization (Fig. 4), sst1 is unlikely to mediate its effects, because this receptor shows a low internalization rate (Hofland and Lamberts, 2003). Thus, we tested whether binding to sst2 and sst4 would increase tau phosphorylation at the Ser262 site.



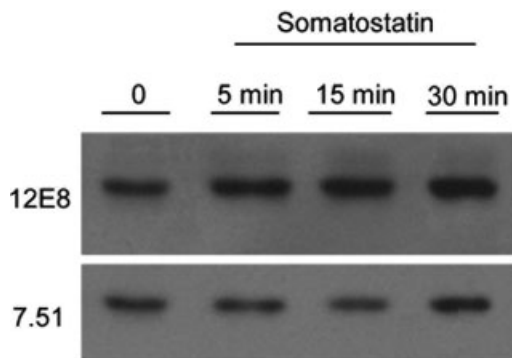
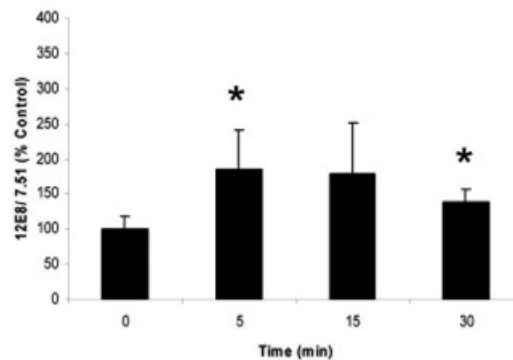


Fig. 3. Effect of somatostatin on tau phosphorylation at Ser262 site in primary cortical neurons in culture. Neurons were treated with 50 nM somatostatin for 5, 15, and 30 min, and then Western blots were carried out. Quantification (right panel) of tau phosphorylation at the Ser262 site recognized by 12E8 antibody was performed by densitometric analysis in arbitrary units. Tau phosphorylation data



were normalized with total tau level detected by 7.51 antibody. The level of tau phosphorylation at Ser262 site was increased twofold in the presence of 50 nM somatostatin for only 5 min ( $257\% \pm 101\%$  vs.  $100\% \pm 19\%$  in control samples;  $P < 0.05$ ). Data are means  $\pm$  SEM of experiments carried out in triplicate. \* $P < 0.05$  vs. control.

### Octreotide Does Not Affect Tau Phosphorylation at Ser262

To investigate further the possible mechanism for cortistatin influence on tau phosphorylation at Ser262, we treated primary cortical neurons with octreotide, a somatostatin octapeptide analogue that binds selectively to sst2, sst3, and sst5 receptors. As previously shown with cortistatin and somatostatin, neurons in culture were treated with 50 nM octreotide for 5, 15, and 30 min, but, in this case, octreotide does not appear to increase tau phosphorylation at the Ser262 site ( $74\% \pm 13\%$  in 50 nM octreotide 30 min vs.  $100\% \pm 26\%$  in control samples; Suppl. Fig. 2A). To analyze the effect of octreotide concentration on tau phosphorylation, 5 nM, 50 nM, 100 nM, or 500 nM octreotide was added to the media of murine primary cortical neurons for 30 min. Again, no significant effect on tau phosphorylation at Ser262 recognized by 12E8 antibody was observed (Suppl. Fig. 2B).

### Sst2 and Sst4 Are Involved in the Cortistatin Action To Promote Tau Phosphorylation at Ser262

To determine the somatostatin receptor subtypes involved in the effect of cortistatin on tau phosphorylation at Ser262, we studied primary cortical neurons obtained from different strains of somatostatin receptor-deficient mice. Cells were incubated with 50 nM cortistatin for 5, 15, and 30 min, and tau phosphorylation at Ser262 was analyzed by Western blot. In both sst2 and sst4 knockout cultures, cortistatin had no significant effect on tau phosphorylation at the Ser262 site (Fig. 5B,C). Similar results were found in sst2/4 double-knockout cells (data not shown). These results suggest that the effect of cortistatin on tau phosphorylation is mediated, at least in part, through sst2 and sst4 receptors.

### Cortistatin Increases Tau Phosphorylation at Ser262 Probably Through Its Binding to Heterodimeric Receptors Composed of Sst2 and Sst4 Subunits

To investigate further which somatostatin receptor subtype mediates the effect of cortistatin on tau phosphorylation at Ser262 recognized by 12E8 antibody, cortistatin treatments were performed in transiently transfected HEK-293 cells with tau, sst2, and sst4 plasmids. Real-time RT-PCR was used to check the expression of tau, sst2, and sst4 in transiently transfected HEK-293 cells with tau, with both tau and sst2, with both tau and sst4, or with tau, sst2, and sst4 together. In all the transfections performed, tau, sst2, and sst4 mRNAs were detected (Suppl. Fig. 3).

Transiently transfected HEK-293 cells were treated with different concentrations of cortistatin (5–500 nM) for 30 min. Incubations with 200 nM or 500 nM cortistatin increase significantly tau phosphorylation at Ser262 in HEK-293 cells transfected with tau, sst2, and sst4 ( $319\% \pm 58\%$  and  $337\% \pm 5\%$ , respectively, vs.  $100\% \pm 45\%$  control;  $P < 0.05$ ; Fig. 6C). In contrast, cortistatin does not affect tau phosphorylation at Ser262 when added to HEK-293 cells transfected with only tau (data not shown), with both tau and sst2, or with both tau and sst4 (Fig. 6A,B). These experiments suggest that both sst2 and sst4 receptors are necessary to mediate the effect of cortistatin on tau phosphorylation at the epitope Ser262 recognized by 12E8 antibody.

Similarly, different concentrations of somatostatin (5–500 nM) were added for 5 min to transiently transfected HEK-293 cells. However, in this case, no significant effect on tau phosphorylation at Ser262 recognized by 12E8 antibody was observed (data not shown) for tau transfected HEK-293 cells or for HEK-293 transfected with both tau and sst2, with both tau and sst4, or with tau, sst2, and sst4 together. Thus, cortistatin and somato-

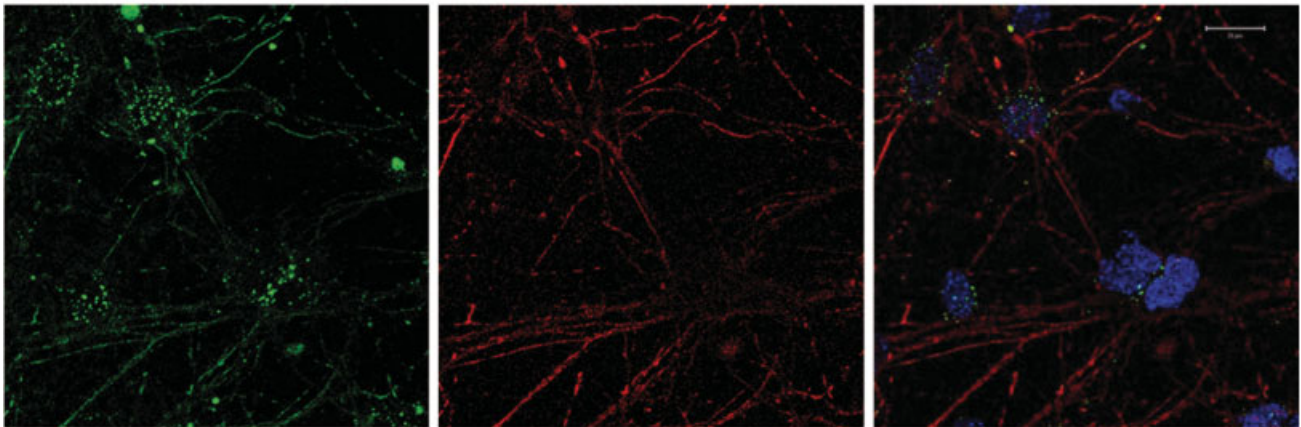
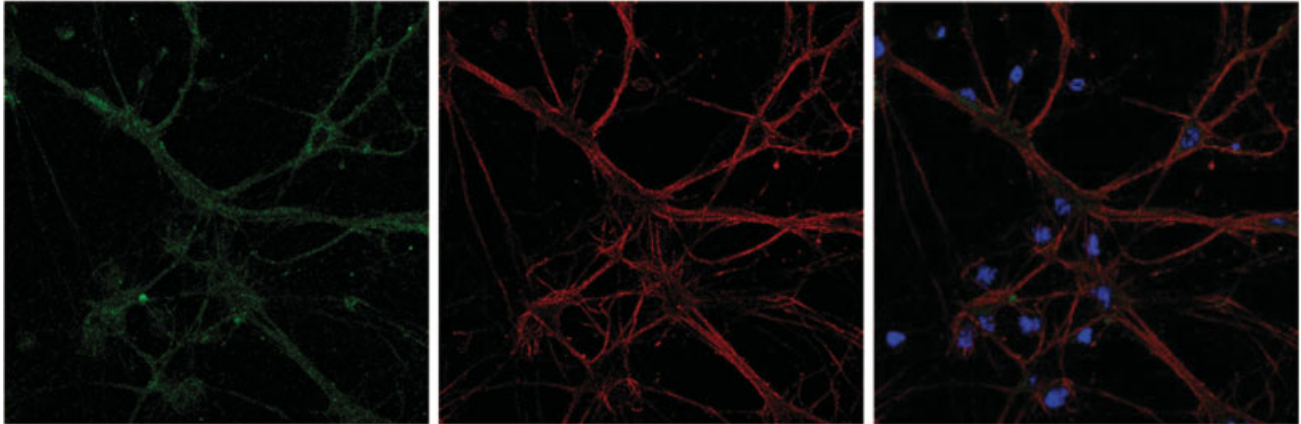
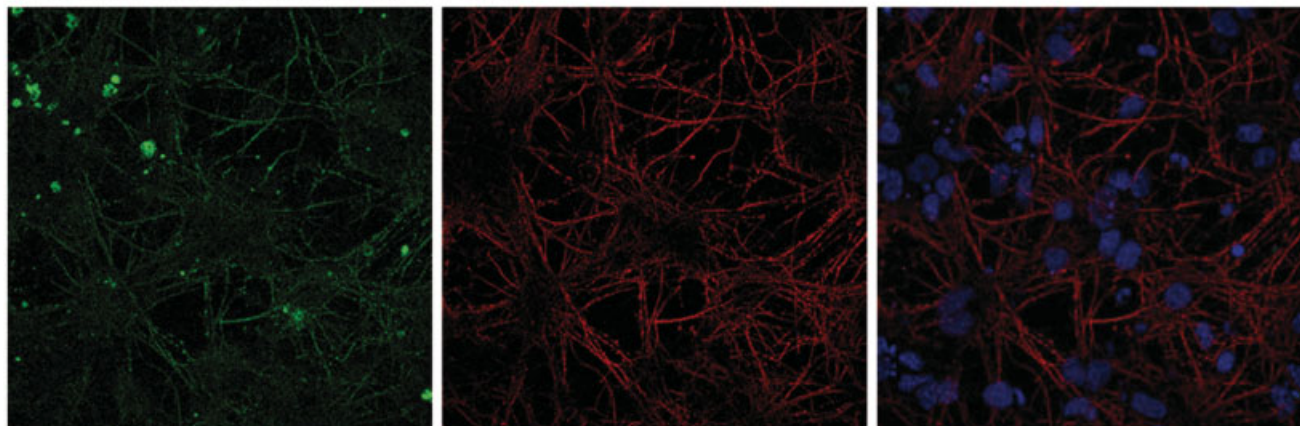
**A. Fluo-cortistatin 30 min****B. Fluo-cortistatin 1 min****C. PAO+Fluo-cortistatin 30 min****Fluo-cortistatin****Tubulin (334 ab)****Merge**

Fig. 4. Internalization of Fluo-cortistatin in cultured cortical neurons. Cells were incubated with 5  $\mu$ M Fluo-cortistatin for 30 min (**A**) and for 1 min (**B**). In another experiment, the primary cultures were pre-treated with 1  $\mu$ M phenylarsine oxide (PAO), an endocytosis inhibitor, for 30 min and then with 5  $\mu$ M Fluo-cortistatin for 30 min (**C**).

The same cells are shown with green fluorescence corresponding to Fluo-cortistatin distribution, red fluorescence showing the distribution of tubulin using polyclonal 334 primary antibody, and blue fluorescence showing nuclei distribution (DAPI stain). Scale bar = 20  $\mu$ m.

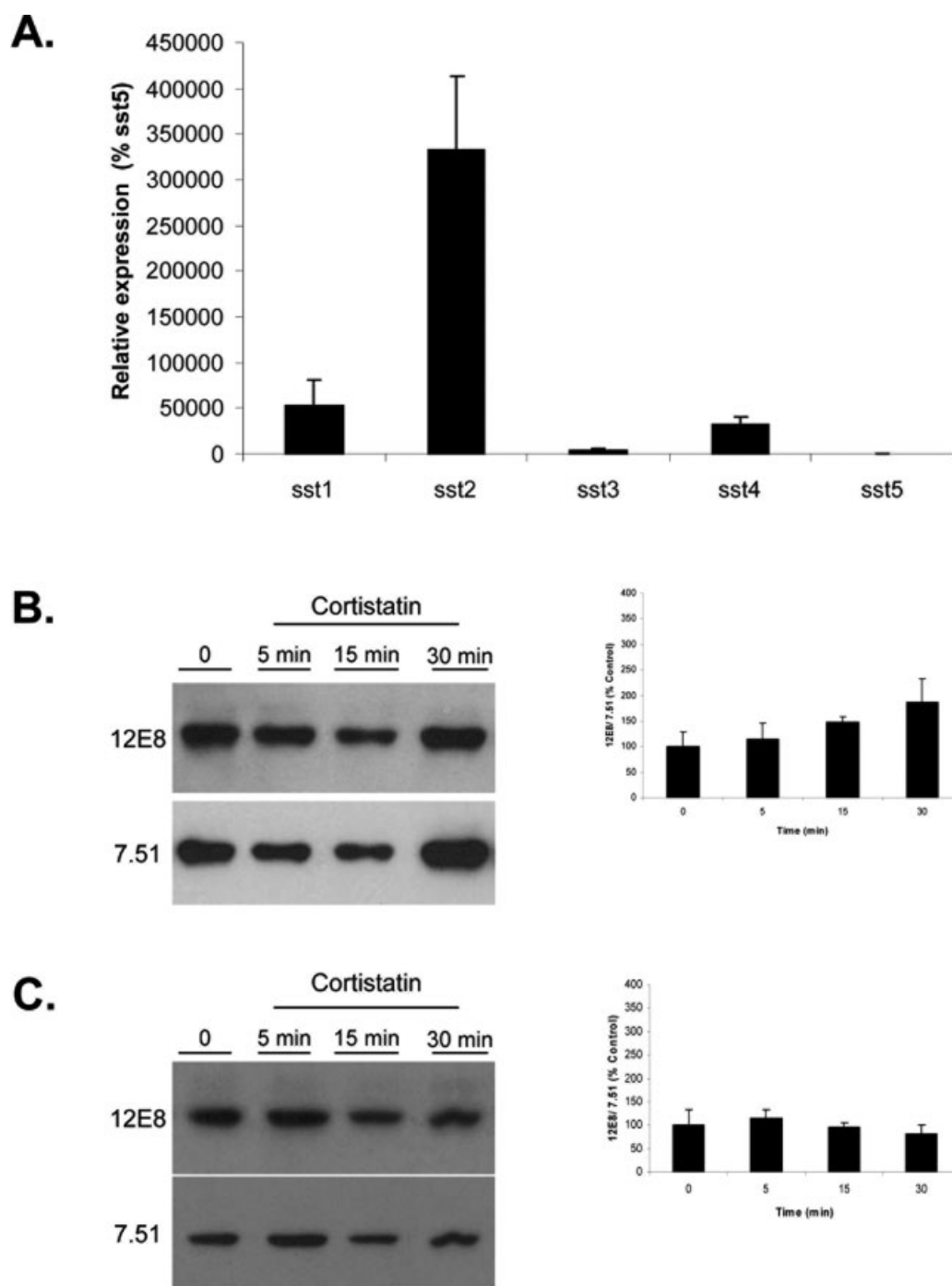


Fig. 5. Expression of each murine somatostatin receptor subtype (sst1–5) in primary cortical neurons with the Sybr Green PCR method (**A**). The mean threshold cycle ( $C_T$ ) values for each somatostatin receptor subtype were normalized by the  $C_T$  value of mouse beta-actin. Data are means  $\pm$  SEM of experiments in triplicate compared with 100% for sst5 (**A**). Effect of cortistatin on tau phosphorylation at Ser262 in primary cortical neurons from sst2 and sst4 knockout mice. Neurons in culture from sst2 knockout mice (**B**) and from sst4 knockout mice (**C**) were incubated with 50 nM cortistatin for 5,

15, and 30 min, and then protein extracts were analyzed by Western blot. Quantification (right panel) of tau phosphorylation at the Ser262 site recognized by 12E8 antibody was performed by densitometric analysis in arbitrary units. Tau phosphorylation data were normalized with total tau level detected by 7.51 antibody. Cortistatin does not increase significantly tau phosphorylation at Ser262 in sst2- and sst4-deficient mice cultures. Experiments performed in duplicate are shown as means  $\pm$  SEM.



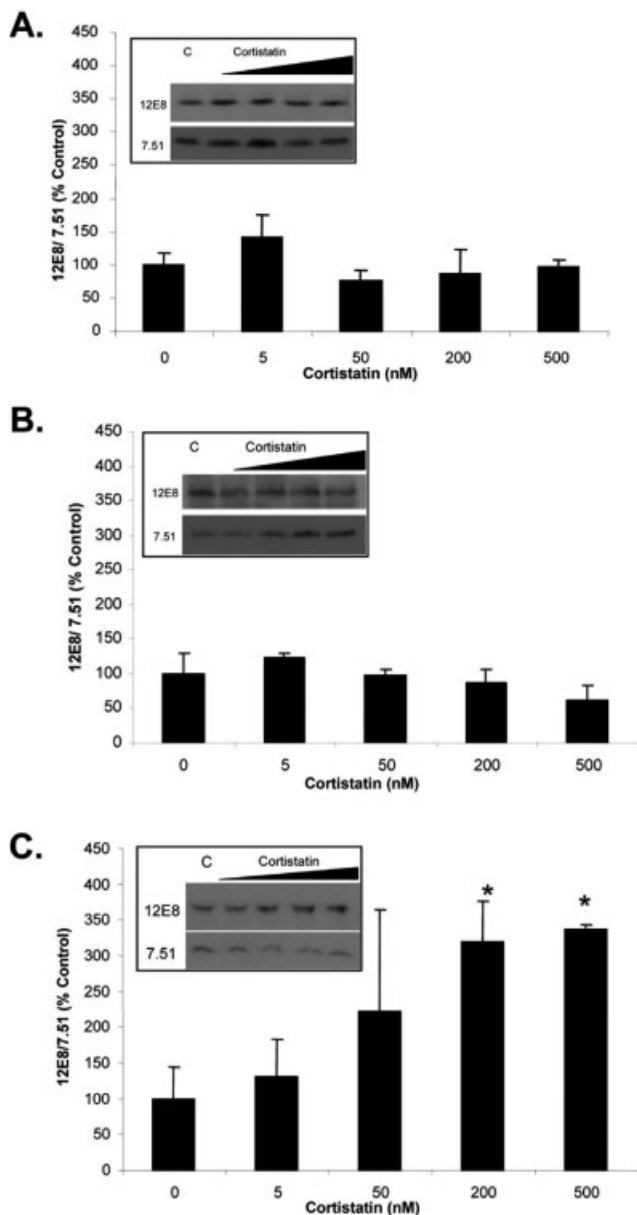


Fig. 6. Tau phosphorylation at Ser262 in HEK-293 cells transiently transfected with tau, sst2, and sst4 cDNA. Transiently transfected HEK-293 cells with both tau and sst2 (A), with both tau and sst4 (B), and with tau, sst2, and sst4 together (C) in the presence of cortistatin at different concentrations (5 nM, 50 nM, 200 nM, and 500 nM) for 30 min. Protein extracts were analyzed by Western blot and quantified by densitometry in arbitrary units. Data of tau phosphorylation at Ser262 recognized by 12E8 antibody were normalized with total tau level detected by 7.51 antibody. Incubations with 200 nM or 500 nM cortistatin increase significantly tau phosphorylation at Ser262 in HEK-293 cells transfected with tau, sst2, and sst4 ( $319\% \pm 58\%$  and  $337\% \pm 5\%$ , respectively, vs.  $100\% \pm 45\%$  control;  $P < 0.05$ ), suggesting that both sst2 and sst4 receptors are involved in the effect of cortistatin on tau phosphorylation at Ser262. Data are means  $\pm$  SEM of experiments carried out in triplicate. \* $P < 0.05$  vs. control.

statin seem to mediate tau phosphorylation at Ser262 by a different mechanism.

### PKC Mediates Tau Phosphorylation at Ser262 Induced by Cortistatin in Murine Cortical Neurons

PLC-PKC signaling seems to be downstream of the somatostatin receptors (Ribalet and Eddlestone, 1995), and PKC is one of the protein kinases that phosphorylates tau at Ser262 (Gomez-Ramos et al., 2003; Xiao-Chuan et al., 2004). Thus, to determine the intracellular protein kinase pathway involved in the modification of tau Ser262 upon addition of cortistatin, we studied primary cultures of cortical neurons treated with Ro 31-8220, a PKC inhibitor.

Figure 7 shows that tau phosphorylation at Ser262 induced by cortistatin was prevented in the presence of 10  $\mu$ M Ro 31-8220. Therefore, these results indicate that PKC mediates the effect of cortistatin on tau phosphorylation at Ser262 site in primary cortical neurons.

### DISCUSSION

In the present study, we have demonstrated that cortistatin promotes tau phosphorylation at Ser262 recognized by 12E8 antibody in primary cultures of cortical neurons. P-Ser262 epitope, detected by 12E8 antibody, is an example of a nonproline-directed phosphorylation site (NPK) in tau protein (Morishima-Kawashima et al., 1995). However, no differences were found when the phosphorylation at Ser396/404 site, recognized by PHF1 antibody, a proline-directed phosphorylation site (PKC; Morishima-Kawashima et al., 1995), was tested in the absence or presence of cortistatin. Cortistatin is expressed in GABAergic interneurons in the cortex (de Lecea et al., 1997) and affects the excitability of cortical pyramidal neurons (Schweitzer et al., 2003). Cortistatin induces tau phosphorylation at Ser262 at different concentrations in the nanomolar range, with saturation of the effect at 50 nM. It should be noted that, in studies with fluorescent cortistatin, approximately 24% of cultured neurons showed ligand internalization. Therefore, the effect of cortistatin on the cortical neurons that express cortistatin binding sites should be at least four times higher than the effect observed in the mixed population in primary cultures. Some studies report the relevance of tau phosphorylation at Ser262 in Alzheimer's disease (Morishima-Kawashima et al., 1995; Perez et al., 2005). It is noteworthy that phosphorylation at this residue is modified in the brain of patients with Alzheimer's disease (Morishima-Kawashima et al., 1995). In addition, in double transgenic mice ( $APP^{Swe}/tau^{VW}$ ) that reproduce beta-amyloid and tau pathologies, tau phosphorylation at Ser262 correlates with an increase in the formation of filamentous tau aggregates showing a diameter similar to that of tau filaments observed in Alzheimer's disease (Perez et al., 2005).

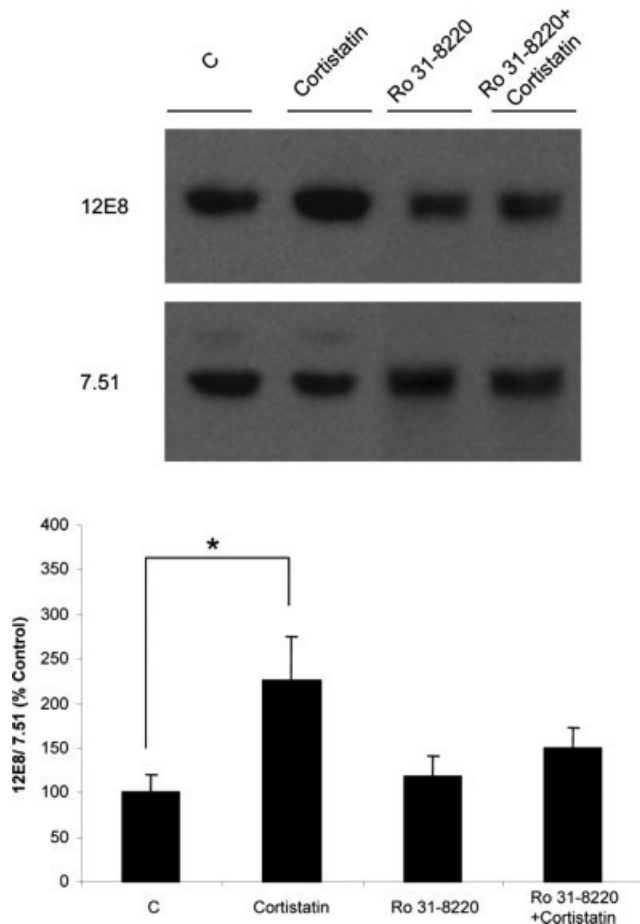


Fig. 7. PKC mediates the effect of cortistatin on tau phosphorylation at Ser262 in primary cortical neurons. Cells were incubated in the presence of 50 nM cortistatin for 30 min or with 10  $\mu$ M Ro 31-8220, a PKC inhibitor, for 90 min or pretreated with 10  $\mu$ M Ro 31-8220 for 60 min followed by 50 nM cortistatin addition for 30 min. Western blots and quantification by densitometry in arbitrary units are shown. Data on tau phosphorylation at Ser262 recognized by 12E8 antibody were normalized with total tau levels detected by 7.51 antibody. Tau phosphorylation at Ser262 induced by cortistatin was prevented when Ro 31-8220 was added, suggesting that PKC mediates the effect of cortistatin on tau phosphorylation at Ser262 site in primary cortical neurons in culture. Data are presented as means  $\pm$  SEM of experiments carried out in triplicate. \* $P < 0.05$  vs. control.

### Somatostatin Receptors and Internalization

Because of the strong structural similarity between cortistatin and somatostatin, cortistatin binds in vitro to the five G-protein-linked seven-transmembrane somatostatin receptors (sst1–5) with affinity similar to that of somatostatin (de Lecea et al., 1996; Fukusumi et al., 1997; Siehler et al., 1998; Criado et al., 1999). Several studies have shown that the interaction of somatostatin or its analogs with somatostatin receptors results in ligand-induced internalization (Hukovic et al., 1996; Boudin et al., 2000; Stroh et al., 2000; Liu et al., 2005). Experi-

ments in cells transfected with each of the somatostatin receptors have shown that, with the exception of sst1, the other receptors can undergo ligand-induced internalization (Hofland and Lamberts, 2003). Our data showing displacement of Fluo-cortistatin with unlabeled somatostatin support the notions that cortistatin binds to somatostatin receptors in cortical neurons in culture and that the ligand-receptor complex is internalized into the cell.

Sst1 and -5 are sparsely detected in the rodent brain, and sst2A, sst2B, sst3, and sst4 receptors are localized in numerous brain regions, including the cerebral cortex (for review see Csaba and Dournaud, 2001; Moller et al., 2003). In addition to somatostatin receptors, both growth hormone (GH)-secretagogue receptor (Deghenghi et al., 2001) and MrgX2 (Robas et al., 2003) have been proposed as selective cortistatin receptors. However, the functional relevance of these receptors in the cerebral cortex remains unclear (Allia et al., 2005). Therefore, only the presence of somatostatin receptors was quantified in primary cortical cultures. In our model, the five somatostatin receptors are shown to be expressed, sst2 being the most abundant, and at least sst2 and sst4 appear to be involved in the binding of cortistatin to cortical neurons.

In this work, octreotide, the somatostatin analogue that binds preferentially to sst2, sst3, and sst5 receptors, has no significant effect on tau phosphorylation at Ser262 site in primary cortical neurons, suggesting that the activation of sst2, sst3, and sst5 probably is not enough to increase tau phosphorylation at Ser262. Supporting this idea, we show that cortistatin does not affect tau phosphorylation at Ser262 in transiently transfected HEK-293 cells with tau and sst2. In contrast, cortistatin promotes tau phosphorylation at Ser262 in transiently transfected HEK-293 cells with tau, sst2, and sst4, suggesting that the effect of cortistatin on tau phosphorylation is mediated through the activation of heterodimeric receptors composed by sst2 and sst4.

### Somatostatin Receptors and Intracellular Signaling

Somatostatin was shown to induce an effect similar to that of cortistatin on tau phosphorylation at Ser262 in primary cortical neurons, but with a different kinetic. It is noteworthy that somatostatin decreases tau phosphorylation at Ser262 in long-lasting incubations, probably by the activation of calcineurin or phosphatase 2B, a phosphatase that dephosphorylates specifically phospho-tau modified at Ser262 (Rahman et al., 2006). Kinetic differences between cortistatin and somatostatin have also been observed when comparing the effects of both peptides on hippocampal excitability. Cortistatin, but not somatostatin, has been shown to enhance a cationic conductance  $I_h$ , suggesting that cortistatin activates signaling pathways different from those activated by somatostatin. These kinetic differences could not be due to differences in the affinity of cortistatin and somatostatin to somatostatin receptors, because similar affinities have been

reported for both ligands (de Lecea et al., 1996; Fukusumi et al., 1997; Siehler et al., 1998; Criado et al., 1999). Kinetic differences between somatostatin and cortistatin may be explained by the notion that cortistatin might bind receptors modified by accessory proteins such as RAMPs (Parameswaran and Spielman, 2006) or heterodimeric receptors (Agnati et al., 2003) essentially different from those for somatostatin. This later possibility is supported by the data from this work.

Tau protein could be phosphorylated at Ser262 by different protein kinases, such as PKA (Scott et al., 1993), MARK (Drewes et al., 1997), CaMKII (Ben-necib et al., 2001), phosphorylase kinase (Paudel, 1997), PK35/41 (Biernat et al., 1993), or PKC (Gomez-Ramos et al., 2003). Because somatostatin binding to somatostatin receptor has been shown to decrease PKA activity (Schindler et al., 1996) but also to activate the PLC-PKC pathway (Ribalet and Eddlestone, 1995), in this work we explored whether PKC could be involved in the effect of cortistatin on tau phosphorylation at Ser262. PKC is responsible for NPDP of tau protein (Correas et al., 1992; Singh et al., 1994; Morishima-Kawashima et al., 1995), and modification at the NPDK sites was shown to affect the interaction of tau with microtubules (Correas et al., 1992; Busciglio et al., 1995). In this work, we suggest that PKC mediates the increase on tau phosphorylation induced by cortistatin, insofar as Ro 31-8220 prevents the increase of tau phosphorylation observed upon the addition of cortistatin.

### Possible Relation of Cortistatin and Somatostatin With Alzheimer's Disease

Significant changes in the expression of somatostatin and somatostatin receptors have been reported in Alzheimer's disease. Somatostatin could be related to some aspects of beta-amyloid pathology, insofar as it regulates the degradation of beta-amyloid by neprilysin (Saito et al., 2005). Somatostatin concentration was shown to be decreased in the brain and cerebrospinal fluid (CSF) of Alzheimer's disease patients (Davies et al., 1980; Bisette et al., 1998; Nilsson et al., 2001). On the other hand, Kumar (2005) showed that the levels of somatostatin receptors sst4 and sst5 are reduced in Alzheimer's disease cortex. This result seems to contradict our results, but, in Kumar's work, the decrease was observed at the last stage of the disease. Thus, at earlier stages (which we try to mimic), a higher amount of sst4 receptor should be present. In any case, the amount that remains in the last stage of the disease may be sufficient to transmit cortistatin signal.

With regard to tau pathology, here we have shown that cortistatin promotes tau phosphorylation at Ser262 site in cortical neurons. The main risk for Alzheimer's disease is aging, and mRNA expression of preprocortistatin is significantly increased in the same brain regions during aging (Winsky-Sommerer et al., 2004). Thus, an increase in preprocortistatin may result in an increase of cortistatin that will result, as indicated in this work, in

an increase of tau phosphorylation at Ser262. We have found, first, that tau phosphorylation at Ser262 is reduced in the cortex of cortistatin-deficient mice and, second, that cortistatin increases tau phosphorylation at the same site in primary cortical neurons in culture, probably through the binding to heterodimeric somatostatin receptors composed of sst2 and sst4. Interestingly, immunohistochemistry experiments in rat brain show a high degree of colocalization between sst2 and sst4 in layer V of cortical pyramidal cells but not in hippocampal CA1 (Schreff et al., 2000). This result supports the fact that cortistatin effect, mediated through sst2 and sst4, was observed only in cortex but not in hippocampus. Indeed, our hypothesis is that, in the cortex of aged wild-type animals, cortistatin may induce phosphorylation of tau at Ser262, and it may result in a decrease of microtubule stability. The effect of cortistatin on tau phosphorylation at Ser262 is found mainly in the cortex, and it may play a role in the intermediate steps described for tau pathology in Alzheimer's disease (Delacourte et al., 1999). This result could be relevant in explaining the memory consolidation deficits related to Alzheimer's disease. In this disease, neuronal death, associated with tau and beta-amyloid pathologies, begins in the entorhinal cortex and then continues through the hippocampus and into the cortex (Braak and Braak, 1991), which is responsible for memory consolidation (Hyman et al., 1984). In this process, a role for cortistatin has been suggested (de Lecea et al., 1996), and overexpression of cortistatin in transgenic mice has been shown to decrease cognitive performance (Tallent et al., 2005). Because of its pattern of expression within the central nervous system at hippocampus and cortex, and its role in tau phosphorylation at Ser262, the role of cortistatin in Alzheimer's disease pathology should be studied further.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Patrice Bourgin for his generous help with real-time PCR.

### REFERENCES

- Agnati LF, Ferre S, Lluís C, Franco R, Fuxe K. 2003. Molecular mechanisms and therapeutic implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons. *Pharmacol Rev* 55:509-550.
- Allia E, Tarabra E, Volante M, Cerrato M, Ghigo E, Muccioli G, Papotti M. 2005. Expression of cortistatin and MrgX2, a specific cortistatin receptor, in human neuroendocrine tissues and related tumours. *J Pathol* 207:336-345.
- Alzheimer A. 1906. *Neurologisches Zentralblatt* 25:146-148.
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. 1992. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42:631-639.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. 2004. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84:361-384.
- Banker GA, Cowan WM. 1977. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res* 126:397-342.

- Benneic M, Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 2001. Inhibition of PP-2A upregulates CaMKII in rat forebrain and induces hyperphosphorylation of tau at Ser 262/356. *FEBS Lett* 490:15–22.
- Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1993. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11:153–163.
- Bissette G, Cook L, Smith W, Dole KC, Crain B, Nemeroff CB. 1998. Regional neuropeptide pathology in Alzheimer's disease: corticotropin-releasing factor and somatostatin. *J Alzheimers Dis* 1:91–105.
- Boudin H, Sarret P, Mazella J, Schonbrunn A, Beaudet A. 2000. Somatostatin-induced regulation of SST(2A) receptor expression and cell-surface availability in central neurons: role of receptor internalization. *J Neurosci* 20:5932–5939.
- Braak H, Braak E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239–259.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA. 1995. beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14:879–888.
- Correas I, Diaz-Nido J, Avila J. 1992. Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain. *J Biol Chem* 267:15721–15728.
- Criado JR, Li H, Jiang X, Spina M, Huitron-Resendiz S, Liapakis G, Calbet M, Siehler S, Henriksen SJ, Koob G, Hoyer D, Sutcliffe JG, Goodman M, de Lecea L. 1999. Structural and compositional determinants of cortistatin activity. *J Neurosci Res* 56:611–619.
- Cristiani R, Fontanesi G, Casini G, Petrucci C, Viollet C, Bagnoli P. 2000. Expression of somatostatin subtype 1 receptor in the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3191–3199.
- Csaba Z, Dournaud P. 2001. Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides* 35:1–23.
- Davies P, Katzman R, Terry RD. 1980. Reduced somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer's disease and Alzheimer senile dementia. *Nature* 288:279–280.
- de Lecea L, Criado JR, Prospero-Garcia O, Gautvik KM, Schweitzer P, Danielson PE, Dunlop CL, Siggins GR, Henriksen SJ, Sutcliffe JG. 1996. A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* 381:242–245.
- de Lecea L, del Rio JA, Criado JR, Alcantara S, Morales M, Danielson PE, Henriksen SJ, Soriano E, Sutcliffe JG. 1997. Cortistatin is expressed in a distinct subset of cortical interneurons. *J Neurosci* 17:5868–5880.
- Deghenghi R, Papotti M, Ghigo E, Muccioli G. 2001. Cortistatin, but not somatostatin, binds to growth hormone secretagogue (GHS) receptors of human pituitary gland. *J Endocrinol Invest* 24:RC1–RC3.
- Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buee L, Watzet A, Vermersch P, Ghazali F, Fallet-Bianco C, Pasquier F, Lebert F, Petit H, Di Menza C. 1999. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52:1158–1165.
- Diaz-Nido J, Serrano L, Lopez-Otin C, Vandekerckhove J, Avila J. 1990. Phosphorylation of a neuronal-specific beta-tubulin isotype. *J Biol Chem* 265:13949–13954.
- Drewes G, Ebner A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1997. MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89:297–308.
- Feindt J, Becker I, Blomer U, Hugo HH, Mehdorn HM, Krisch B, Mentlein R. 1995. Expression of somatostatin receptor subtypes in cultured astrocytes and gliomas. *J Neurochem* 65:1997–2005.
- Flood JF, Uezu K, Morley JE. 1997. The cortical neuropeptide, cortistatin-14, impairs post-training memory processing. *Brain Res* 775:250–252.
- Fukusumi S, Kitada C, Takekawa S, Kizawa H, Sakamoto J, Miyamoto M, Hinuma S, Kitano K, Fujino M. 1997. Identification and characterization of a novel human cortistatin-like peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 232:157–163.
- Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA. 1989. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J* 8:393–399.
- Goedert M, Cohen ES, Jakes R, Cohen P. 1992. p42 MAP kinase phosphorylation sites in microtubule-associated protein tau are dephosphorylated by protein phosphatase 2A1. Implications for Alzheimer's disease [corrected]. *FEBS Lett* 312:95–99.
- Gomez-Ramos A, Diaz-Nido J, Smith MA, Perry G, Avila J. 2003. Effect of the lipid peroxidation product acrolein on tau phosphorylation in neural cells. *J Neurosci Res* 71:863–870.
- Greenberg SG, Davies P, Schein JD, Binder LI. 1992. Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. *J Biol Chem* 267:564–569.
- Heidet V, Faivre-Bauman A, Kordon C, Loudes C, Rasolonjanahary S, Epelbaum J. 1990. Functional maturation of somatostatin neurons and somatostatin receptors during development of mouse hypothalamus in vivo and in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* 57:85–92.
- Hofland LJ, Lamberts SW. 2003. The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance. *Endocrine Rev* 24:28–47.
- Hosli E, Hosli L. 1994. Colocalization of binding sites for somatostatin, muscarine and nicotine on cultured neurones of rat neocortex, cerebellum, brain stem and spinal cord: combined autoradiographic and immunohistochemical studies. *Neurosci Lett* 173:71–74.
- Hukovic N, Panetta R, Kumar U, Patel YC. 1996. Agonist-dependent regulation of cloned human somatostatin receptor types 1–5 (hSSTR1–5): subtype selective internalization or upregulation. *Endocrinology* 137:4046–4049.
- Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL. 1984. Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* 225:1168–1170.
- Iqbal K, Grundke-Iqbal I. 1997. Mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration and the formation of tangles. *Mol Psychiatry* 2:178–180.
- Kumar U. 2005. Expression of somatostatin receptor subtypes (SSTR1–5) in Alzheimer's disease brain: an immunohistochemical analysis. *Neuroscience* 134:525–538.
- Liu Q, Cescato R, Dewi DA, Rivier J, Reubi JC, Schonbrunn A. 2005. Receptor signaling and endocytosis are differentially regulated by somatostatin analogs. *Mol Pharmacol* 68:90–101.
- Mentlein R, Buchholz C, Krisch B. 1990. Somatostatin-binding sites on rat telencephalic astrocytes. Light- and electron-microscopic studies in vitro and in vivo. *Cell Tissue Res* 262:431–443.
- Moller LN, Stidsen CE, Hartmann B, Holst JJ. 2003. Somatostatin receptors. *Biochim Biophys Acta* 1616:1–84.
- Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Titani K, Ihara Y. 1995. Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem* 270:823–829.
- Nilsson CL, Brinkmalm A, Minthon L, Blennow K, Ekman R. 2001. Processing of neuropeptide Y, galanin, and somatostatin in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Peptides* 22:2105–2112.
- Novak M, Jakes R, Edwards PC, Milstein C, Wischik CM. 1991. Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 7.51. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5837–5841.
- Otvos L Jr, Feiner L, Lang E, Szendrei GI, Goedert M, Lee VM. 1994. Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *J Neurosci Res* 39:669–673.



- Parameswaran N, Spielman WS. 2006. RAMPs: the past, present and future. *Trends Biochem Sci* (in press).
- Paudel HK. 1997. The regulatory Ser262 of microtubule-associated protein tau is phosphorylated by phosphorylase kinase. *J Biol Chem* 272:1777–1785.
- Perez M, Ribe E, Rubio A, Lim F, Moran MA, Ramos PG, Ferrer I, Isla MT, Avila J. 2005. Characterization of a double (amyloid precursor protein-tau) transgenic: tau phosphorylation and aggregation. *Neuroscience* 130:339–347.
- Rahman A, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 2006. PP2B isolated from human brain preferentially dephosphorylates Ser-262 and Ser-396 of the Alzheimer disease abnormally hyperphosphorylated tau. *J Neural Transm* 113:219–230.
- Riballet B, Eddlestone GT. 1995. Characterization of the G protein coupling of a somatostatin receptor to the K<sup>+</sup>ATP channel in insulin-secreting mammalian HIT and RIN cell lines. *J Physiol* 485:73–86.
- Robas N, Mead E, Fidock M. 2003. MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion. *J Biol Chem* 278:44400–44404.
- Saito T, Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Takano J, Huang SM, Suemoto T, Higuchi M, Saido TC. 2005. Somatostatin regulates brain amyloid beta peptide Abeta42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat Med* 11:434–439.
- Sanchez-Alavez M, Gomez-Chavarin M, Navarro L, Jimenez-Anguiano A, Murillo-Rodriguez E, Prado-Alcala RA, Drucker-Colin R, Prospero-Garcia O. 2000. Cortistatin modulates memory processes in rats. *Brain Res* 858:78–83.
- Scott CW, Spreen RC, Herman JL, Chow FP, Davison MD, Young J, Caputo CB. 1993. Phosphorylation of recombinant tau by cAMP-dependent protein kinase. Identification of phosphorylation sites and effect on microtubule assembly. *J Biol Chem* 268:1166–1173.
- Schindler M, Humphrey PP, Emson PC. 1996. Somatostatin receptors in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 50:9–47.
- Schreff M, Schulz S, Handel M, Keilhoff G, Braun H, Pereira G, Klutzy M, Schmidt H, Wolf G, Holtt V. 2000. Distribution, targeting, and internalization of the sst4 somatostatin receptor in rat brain. *J Neurosci* 20:3785–3797.
- Seubert P, Mawal-Dewan M, Barbour R, Jakes R, Goedert M, Johnson GV, Litsky JM, Schenk D, Lieberburg I, Trojanowski JQ, et al. 1995. Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J Biol Chem* 270:18917–18922.
- Siehl S, Seuwen K, Hoyer D. 1998. [<sup>125</sup>I]Tyr10-cortistatin14 labels all five somatostatin receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 357:483–489.
- Singh TJ, Grundke-Iqbal I, McDonald B, Iqbal K. 1994. Comparison of the phosphorylation of microtubule-associated protein tau by non-proline dependent protein kinases. *Mol Cell Biochem* 131:181–189.
- Stroh T, Jackson AC, Dal Farra C, Schonbrunn A, Vincent JP, Beaudet A. 2000. Receptor-mediated internalization of somatostatin in rat cortical and hippocampal neurons. *Synapse* 38:177–186.
- Tallent MK, Fabre V, Qiu C, Calbet M, Lamp T, Baratta MV, Suzuki C, Levy CL, Siggins GR, Henriksen SJ, Criado JR, Roberts A, de Lecea L. 2005. Cortistatin overexpression in transgenic mice produces deficits in synaptic plasticity and learning. *Mol Cell Neurosci* 30:465–475.
- van Calcar D, Muller M, Hamprecht B. 1980. Regulation by secretin, vasoactive intestinal peptide, and somatostatin of cyclic AMP accumulation in cultured brain cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:6907–6911.
- Videau C, Hochgeschwender U, Kreienkamp HJ, Brennan MB, Viollet C, Richter D, Epelbaum J. 2003. Characterisation of [<sup>125</sup>I]Tyr0DTrp8-somatostatin binding in sst1- to sst4- and SRIF-gene-invalidated mouse brain. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367:562–571.
- Winsky-Sommerer R, Spier AD, Fabre V, de Lecea L, Criado JR. 2004. Overexpression of the human beta-amyloid precursor protein downregulates cortistatin mRNA in PDAPP mice. *Brain Res* 1023:157–162.
- Xiao-Chuan W, Zheng-Hui H, Zheng-Yu F, Yue F, Yun-Huang Y, Qun W, Xiao-Wei T, Yi-Gen W, Jian-Zhi W. 2004. Correlation of Alzheimer-like tau hyperphosphorylation and fMRI bold intensity. *Curr Alzheimer Res* 1:143–148.





